

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann

MicroRNAs im Serum
als Biomarker beim feline Diabetes mellitus

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Stefanie Nicole Fleischhacker
aus Frankfurt am Main

München 2014

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Katrin Hartmann
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Tag der Promotion:

08. Februar 2014

Meinen lieben Eltern

Gefördert durch ein Promotionsstipendium nach dem
Bayerischen Eliteförderungsgesetz der Universität Bayern e.V.

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT: MICRORNAS	2
1.	Entdeckung der microRNAs	2
2.	Bedeutung von microRNAs	4
3.	Vorkommen von microRNAs im Organismus.....	5
4.	Biogenese der microRNAs	7
5.	Funktion der microRNAs	12
6.	Nachweis von microRNAs	13
6.1.	MicroRNA-Microarrays	13
6.2.	Next-Generation-Sequencing	14
6.3.	Reverse-Transkription-quantitative-Real-Time-PCR.....	14
6.4.	Weitere Nachweismethoden.....	15
7.	MicroRNAs und Diabetes mellitus Typ 2	15
7.1.	Rolle im endokrinen Pankreas und in der β -Zell-Dysfunktion	16
7.2.	Rolle bei der Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe.....	19
7.3.	Rolle als Biomarker beim Diabetes mellitus Typ 2.....	20
III.	PUBLIKATION.....	23
1.	Published Article.....	23
2.	Published Supplementary Data	30
IV.	DISKUSSION	35
V.	ZUSAMMENFASSUNG	45
VI.	SUMMARY.....	47
VII.	LITERATURVERZEICHNIS	49
VIII.	DANKSAGUNG	74

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
$\Delta\Delta\text{Cq}$ -Methode	delta-delta-quantification-cycle-Methode
α	alpha
β	beta
μl	Mikroliter
3'/5'-UTR	untranslatierte Region des 3'/5'-Endes
<i>375/ob</i>	Mäuse mit einem Knockout von miR-375 und Leptin
<i>375KO</i>	miR-375-Knockout-Mäuse
3T3-L1	Mouse embryonic fibroblast-adipose-like cell line 3T3-L1
AGO	Argonaut
AKT	Proteinkinase B
ARNT	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
ATP	Adenosintriphosphat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary Deoxyribonucleic Acid (komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
c-Kit	eine Rezeptor-Tyrosinkinase
<i>db/db</i> -Mäuse	Mausmodell mit Loss-of-function-Mutation im Leptinrezeptor-Gen
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8
GK-Ratten	Goto-Kakizaki-Ratten
GLUT4	Glukosetransporter Typ 4
GSIS	Glukose-stimulierte Insulinsekretion
GW182	glycine-tryptophan protein of 182 kDa
HDL	high-density lipoprotein (Lipoprotein hoher Dichte)
INS-1E	Insulinoma-1E, eine Ratten- β -Zelllinie
kDa	Kilodalton
MafA	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein A (avian)
Map4k4	Mitogen-aktivierte-Protein-4-Kinase-4
MIN6	Mouse Insulinoma, 6. Subklon, eine β -Zelllinie
miRISC	miRNA-induced silencing complex
miRNA	microRNA
miRNP	miRNA-Ribonukleoprotein-Komplex
mRNA	messenger RNA
Mtpn	Myotrophin

n	Anzahl
NGS	Next-Generation-Sequencing
nt	Nukleotide
<i>ob/ob</i> -Mäuse	Mausmodell mit Loss-of-function-Mutation im Leptin-Gen
OH-Gruppe	Hydroxyl-Gruppe
ORF	Open Reading Frame (Offenes Leseraster)
ORP8	oxysterol-binding-protein-related protein-8
PACT	protein kinase R activating protein
PAZ	Piwi-Argonaut-Zwille
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDK1	3'-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase-1
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
pre-miRNA	precursor miRNA (Vorläufer-miRNA)
pri-miRNA	primary miRNA (primäre miRNA)
qPCR	quantitative-Real-Time-PCR
Ran-GTP	Ran-Guanin Triphosphatase
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
RT-qPCR	Reverse Transcription quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (Reverse-Transkription-quantitative-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion)
SIRT1	Sirtuin-1
snRNA	small nuclear RNA
sog.	sogenanntes
Stxbp1	Syntaxin-bindendes-Protein-1
T2DM	Typ-2-Diabetes-mellitus
TRBP	human immunodeficiency virus-1 transactivating response RNA binding protein
u. a.	unter anderem
UCP2	Uncoupling-Protein-2
z. B.	zum Beispiel

I. EINLEITUNG

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten metabolischen Erkrankungen beim Menschen mit zurzeit 371 Millionen Betroffenen weltweit (GUARIGUATA, 2012). Bei der Katze ist Diabetes mellitus die zweithäufigste Endokrinopathie mit einer Prävalenz von ca. 0,5 % bei Hauskatzen und bis zu 2 % bei Burmesen (OSTO et al., 2013). Beide Spezies erkranken überwiegend am Typ-2-Diabetes-mellitus (T2DM), der durch eine Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe sowie eine β -Zell-Dysfunktion gekennzeichnet ist (REUSCH et al., 2006; GASTALDELLI, 2011). Solange die β -Zellen noch eine Restfunktion besitzen, kann eine Insulintherapie bei Katzen mit T2DM zu einer Remission des Diabetes führen (OSTO et al., 2013).

MicroRNAs (MiRNAs) sind kurze, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (RNA), die überwiegend repressive Effekte auf die Genexpression vermitteln. Sie sind in die Steuerung physiologischer Prozesse ebenso involviert wie in die Pathogenese zahlreicher Krankheiten wie etwa Tumor- und Herzerkrankungen, aber auch T2DM (HUANG et al., 2011a). Während frühe Studien die Veränderungen intrazellulärer miRNAs untersuchten, rücken seit etwa fünf Jahren die miRNA-Expressionsmuster im Serum und anderen zellfreien Körperflüssigkeiten in den Fokus der Forschung, da zirkulierende miRNAs aufgrund ihrer hohen Stabilität ein großes Potential als diagnostische und prognostische Biomarker aufweisen (GILAD et al., 2008). Für Maus, Ratte und Mensch existieren bereits zahlreiche Assays zum Nachweis von miRNAs. Viele dieser Tests können für andere Tierarten verwendet werden, da die Sequenzen der miRNAs zwischen verschiedenen Spezies oft hoch konserviert sind (BOGGS et al., 2008; JOPLING, 2012).

Die Erforschung der miRNAs könnte somit entscheidend dazu beitragen, sowohl die Pathogenese des humanen als auch des felines T2DM weiter aufzuklären, sensitive und spezifische Biomarker für eine frühzeitige Diagnose und sichere Prognose zu entwickeln und eine effektivere Therapie zu ermöglichen. Da für die Katze bisher keine Studien zum Nachweis von miRNAs existieren, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, (i) zirkulierende miRNAs im Katzenserum nachzuweisen, (ii) miRNA-Expressionsprofile gesunder und diabetischer Katzen zu erstellen und (iii) zu untersuchen, inwieweit die Remission eines Diabetes die Expression der Serum-miRNAs verändert.

II. LITERATURÜBERSICHT: MICRORNAS

1. Entdeckung der microRNAs

MiRNAs sind endogene, hoch konservierte, ca. 22 Nukleotide (nt) lange, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren, die überwiegend repressive Effekte auf die Genexpression auf post-transkriptionaler Ebene vermitteln (BARTEL, 2004; JOPLING, 2012). Die erste miRNA, lin-4, wurde im Nematoden *Caenorhabditis elegans* entdeckt. Lin-4 spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gens lin-14, dessen Unterdrückung notwendig für die korrekte Weiterentwicklung vom Larvenstadium 1 zum Larvenstadium 2 ist (WIGHTMAN et al., 1991; WIGHTMAN et al., 1993). LEE und Mitarbeiter fanden im Jahr 1993 heraus, dass das lin-4-Gen nicht, wie üblich, für ein Protein, sondern für zwei kurze RNA-Moleküle mit einer Länge von 22 und 61 nt kodiert. Es wurde angenommen, dass das längere Transkript eine haarnadelartige Struktur aufweist und den Vorläufer der kürzeren RNA darstellt (LEE et al., 1993). Die Sequenz dieser lin-4-RNA erwies sich als komplementär zu einer wiederkehrenden Sequenz in der untranslatierten Region des 3'-Endes (3'-UTR) der lin-14-messenger-RNA (mRNA) (WIGHTMAN et al., 1993). Durch eine Antisense-Basenpaarung war eine Interaktion zwischen der lin-4-RNA und der lin-14-mRNA somit möglich, welche zu einer Unterdrückung der LIN-14-Proteinbiosynthese bei konstanten lin-14-mRNA-Leveln führte (LEE et al., 1993; WIGHTMAN et al., 1993).

Mit lin-4 war das erste Mitglied einer neuen Klasse von Ribonukleinsäuren, den microRNAs, entdeckt worden. Ihre Existenz sollte das Verständnis über die Regulation der Genexpression fundamental verändern. Allerdings dauerte es weitere sieben Jahre, bis die Tragweite dieser Entdeckung klar wurde, da die Unterdrückung der Translation durch eine nicht-kodierende RNA für eine Kuriosität in *Caenorhabditis* gehalten wurde (AMBROS, 2008). Erst im Jahr 2000 wurde die zweite ca. 21 nt lange miRNA, als let-7 bezeichnet, ebenfalls in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (REINHART et al., 2000). Let-7 erwies sich in vielen Spezies, u. a. auch dem Menschen, als evolutionär konserviert. Diese Erkenntnis ließ erstmals den Verdacht aufkommen, dass die Genexpression generell durch kurze, nicht-kodierende Ribonukleinsäuren reguliert werden könnte (PASQUINELLI et al., 2000). Nachdem ein Jahr später zahlreiche dieser

Ribonukleinsäuren, außer in Würmern und Fliegen, auch in Säugetieren, einschließlich dem Menschen, nachgewiesen werden konnten, wurden diese Ribonukleinsäuren – nun als microRNAs bezeichnet – als neue Klasse anerkannt (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; LEE & AMBROS, 2001).

Bis zum heutigen Tag wurden miRNAs in zahlreichen Tieren, Pflanzen und sogar Viren nachgewiesen. Dabei zeigte sich, dass die Sequenzen der einzelnen miRNAs in der Regel auch zwischen weiter entfernten Spezies hoch konserviert sind (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; REINHART et al., 2002; BOGGS et al., 2008; GRASSMANN & JEANG, 2008; IBANEZ-VENTOSO et al., 2008). Aktuell werden 24521 Vorläufer (precursor) und 30424 prozessierte (mature) miRNAs in 206 Spezies in der Datenbank mirBase (Version 20, <http://microrna.sanger.ac.uk/>) gelistet (GRIFFITHS-JONES, 2004; GRIFFITHS-JONES et al., 2006; GRIFFITHS-JONES et al., 2008; KOZOMARA & GRIFFITHS-JONES, 2011). Allein für den Menschen sind mehr als 1800 precursor und mehr als 2500 mature miRNAs aufgeführt. In der Datenbank sind ferner die miRNA-Informationen für die klassischen Labortiere Maus und Ratte sowie für einige Haus- und Nutztiere zu finden (Tabelle 1). Für die Katze (*Felis catus*) wurden bisher noch keine miRNAs experimentell nachgewiesen. Lediglich eine Studie zur Sequenzierung des Katzensgenoms identifizierte Sequenzen, bei denen es sich potentiell um miRNAs handeln könnte (PONTIUS et al., 2007).

Tabelle 1: Anzahl (n) der in mirBase Version 20 gelisteten microRNAs ausgewählter Spezies

Spezies	Precursor microRNAs (n)	Mature microRNAs (n)
<i>Homo sapiens</i>	1872	2578
<i>Mus musculus</i>	1186	1908
<i>Gallus gallus</i>	734	996
<i>Bos taurus</i>	798	783
<i>Rattus norvegicus</i>	449	728
<i>Equus caballus</i>	341	360
<i>Sus scrofa</i>	280	326
<i>Canis familiaris</i>	324	291
<i>Ovis aries</i>	105	153

2. Bedeutung von microRNAs

Aktuell wird angenommen, dass ungefähr 60 % aller humanen protein-kodierenden Gene miRNA-Ziele darstellen (FRIEDMAN et al., 2009). Die Genregulation durch miRNAs ist dabei sehr komplex, da auf der einen Seite eine einzige miRNA hunderte verschiedener mRNAs beeinflussen und auf der anderen Seite eine einzelne mRNA durch mehr als eine miRNA reguliert werden kann (LEWIS et al., 2003; SELBACH et al., 2008). Die Identifizierung aller Ziele einer miRNA und somit ihrer biologischen Funktionen stellt somit eine große Herausforderung dar (GUARNIERI & DILEONE, 2008; HUANG et al., 2011a). Gleichzeitig ist aber das detaillierte Verständnis aller Regulationsmechanismen die Grundvoraussetzung, um miRNAs diagnostisch, prognostisch und auch therapeutisch nutzen zu können (HUANG et al., 2011a).

MiRNAs sind an der Steuerung von nahezu allen grundlegenden zellulären Prozessen, wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose, beteiligt (CHEN et al., 2010; VERONESE et al., 2010; GAO et al., 2011; LING et al., 2011). Desweiteren nehmen sie Einfluss auf die Entwicklung von Geweben und Organen und weisen deshalb häufig ein Gewebetyp- und Entwicklungsstadium-spezifisches Expressionsmuster auf (LEE & AMBROS, 2001; LAGOS-QUINTANA et al., 2002; BARTEL, 2004). Die Dysregulation von miRNAs spielt daher eine entscheidende Rolle bei der Entstehung neoplastischer, metabolischer oder kardiovaskulärer Erkrankungen (PERERA & RAY, 2007; HUANG et al., 2011a).

Ein Forschungsschwerpunkt der letzten Jahre war die Rolle von miRNAs in der Pathogenese von Neoplasien. Der erste Hinweis, dass miRNAs in die Onkogenese involviert sein könnten, kam von CALIN und Mitarbeitern im Jahr 2002. Sie fanden heraus, dass die miRNAs miR-15 und miR-16 in der Chromosomenregion 13q14 lokalisiert sind, die bei Patienten mit chronischer lymphatischer B-Zell-Leukämie häufig deletiert ist (CALIN et al., 2002). Inzwischen konnte durch zahlreiche Studien belegt werden, dass miRNAs sowohl als Tumorsuppressoren als auch als Onkogene agieren können (ESQUELA-KERSCHER & SLACK, 2006). Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, dass miRNAs (und insbesondere zirkulierende miRNAs) ein großes Potential besitzen, um Erkrankungen in Zukunft früher und sicherer diagnostizieren, besser prognostisch

einschätzen und gezielter therapieren zu können (KRÜTZFELDT et al., 2005; ZAMPETAKI et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

3. Vorkommen von microRNAs im Organismus

In den ersten Jahren nach ihrer Entdeckung wurden ausschließlich Gewebeproben zum Nachweis von miRNAs verwendet. Erst im Jahr 2008 bewiesen LAWRIE und Mitarbeiter die Existenz von zirkulierenden miRNAs in humanem Serum und Plasma (LAWRIE et al., 2008). Inzwischen wurden miRNAs in nahezu allen Körpergeweben und -flüssigkeiten identifiziert (LAGOS-QUINTANA et al., 2002; CHEN et al., 2008; WEBER et al., 2010). Obwohl RNA-Moleküle bekanntermaßen sehr empfindlich auf äußere Einflüsse reagieren und insbesondere durch die auch im Blut ubiquitär vorhandenen Ribonukleasen (RNasen) üblicherweise einem raschen Abbau unterliegen, erwiesen sich Serum-miRNAs als äußerst stabil gegenüber einer enzymatischen Spaltung durch RNasen, pH-Wert-Veränderungen, extremen Temperaturschwankungen sowie ausgedehnter Lagerungsdauer (CHEN et al., 2008; GILAD et al., 2008; MITCHELL et al., 2008).

MiRNAs erreichen die Zirkulation, indem sie entweder von gesunden oder erkrankten Zellen aktiv sezerniert oder von zugrunde gehenden Zellen infolge von Zellnekrose/-lyse passiv freigesetzt werden (VALADI et al., 2007; HUNTER et al., 2008; SKOG et al., 2008; TAYLOR & GERCEL-TAYLOR, 2008; KOSAKA et al., 2010; WANG et al., 2010; TURCHINOVICH et al., 2011). Je nach Sekretionsmechanismus können zirkulierende miRNAs vesikelgebunden, Lipoprotein-assoziiert oder nicht-vesikelgebunden vorliegen (VICKERS & REMALEY, 2012). Als Vesikel stehen Exosomen, Mikrovesikel und auch apoptotische Körperchen zur Verfügung (VALADI et al., 2007; HUNTER et al., 2008; SKOG et al., 2008; TAYLOR & GERCEL-TAYLOR, 2008; ZERNECKE et al., 2009; KOSAKA et al., 2010; WANG et al., 2010; REID et al., 2011). Desweiteren kann der Transport von zirkulierenden miRNAs auch innerhalb von Lipoproteinen, wie etwa High-Density-Lipoproteinen (HDLs), stattfinden (VICKERS et al., 2011). Nicht-vesikelgebundene miRNAs liegen hingegen mit Proteinen assoziiert vor, wobei Proteine der Argonaut-Familie (AGO-Familie), insbesondere AGO2, eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen (WANG et al., 2010; TURCHINOVICH et al., 2011). Die Stabilität zirkulierender miRNAs

konnte für vesikelgebundene sowie Lipoprotein-assoziierte miRNAs auf die sie umhüllende Lipidschicht zurückgeführt werden, während nicht-vesikelgebundene miRNAs durch die mit ihnen assoziierten AGO-Proteine vor dem Abbau geschützt sind (KOSAKA et al., 2010; WANG et al., 2010; TURCHINOVICH et al., 2011; VICKERS & REMALEY, 2012).

Passiv freigesetzte miRNAs weisen vermutlich keine biologische Aktivität auf. Hingegen existieren inzwischen sowohl *in-vitro*- als auch *in-vivo*-Studien, die nachweisen konnten, dass aktiv sezernierte miRNAs eine entscheidende Rolle in der interzellulären Kommunikation spielen (VICKERS & REMALEY, 2012). Um auf die unterschiedlichen Stoffwechselsituationen angemessen reagieren zu können, muss die Zelle gezielt die benötigten miRNAs auswählen, verpacken und exportieren. Eine derart bedarfsorientierte Selektion konnte bereits für vesikelgebundene sowie HDL-assoziierte zirkulierende miRNAs gezeigt werden (VALADI et al., 2007; KOSAKA et al., 2010; WANG et al., 2010; ZHANG et al., 2010b; VICKERS et al., 2011; VICKERS & REMALEY, 2012). Nach ihrem Export werden die miRNAs dann über die Zirkulation zur Zielzelle transportiert und von dieser über noch nicht näher charakterisierte Mechanismen aufgenommen (ZHANG et al., 2010b; VICKERS & REMALEY, 2012). Für den Import von HDL-assoziierten miRNAs scheint eine Abhängigkeit von der Scavenger-Rezeptor-Klasse-B-Typ I zu bestehen (VICKERS et al., 2011). Nach ihrer Aufnahme sind die transferierten miRNAs dann in der Lage, die Genexpression ihrer Zielzelle spezifisch zu verändern (ZERNECKE et al., 2009; IGUCHI et al., 2010; KOSAKA et al., 2010; ZHANG et al., 2010b; VICKERS et al., 2011). So konnte u. a. gezeigt werden, dass der zirkulierende Tumorsuppressor miR-146a von den Zellen der metastatischen Prostatakrebs-Zelllinie PC-3M-luc aufgenommen wird und dort zu einer Hemmung der Zellproliferation der Tumorzellen führt (KOSAKA et al., 2010). Endothelzellen, die durch Atherosklerose zugrunde gehen, sezernieren apoptotische Körperchen, in denen miR-126 angereichert ist. Benachbarte Gefäßzellen nehmen diese miRNA auf, wodurch es über eine veränderte Chemokin-Expression zur Rekrutierung von Progenitorzellen und einer Reduzierung der atherosklerotischen Plaques kommt (ZERNECKE et al., 2009). Ob auch nicht-vesikelgebundene miRNAs über diese Art der Zell-zu-Zell-Kommunikation eine biologische

Aktivität in Zielzellen ausüben können, bleibt zu klären (TURCHINOVICH et al., 2011; VICKERS & REMALEY, 2012).

Veränderungen im Expressionsmuster zirkulierender miRNAs können somit einerseits als Folge eines pathologischen Zustandes angesehen werden, andererseits wird vermutet, dass sie auch eine konkrete biologische Funktion in der Pathogenese innehaben, da sich ihre Expressionsmuster schon vor dem Auftreten einer Erkrankung zu ändern scheinen. Dies würde bedeuten, dass eine Erkrankung die direkte Folge dysregulierter miRNAs wäre. Zirkulierende miRNAs hätten somit nicht nur eine Bedeutung als Biomarker für verschiedenste Erkrankungen, sondern könnten auch als Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen dienen (RAYNER & HENNESSY, 2013).

4. Biogenese der microRNAs

MiRNA Gene sind sehr häufig in Introns, seltener in Exons von protein-kodierenden und nicht-kodierenden Genen lokalisiert (intragenisch), können aber auch zwischen Genen gelegen sein (intergenisch) (LAU et al., 2001; RODRIGUEZ et al., 2004; KIM & KIM, 2007; UL HUSSAIN, 2012). Nicht selten sind mehrere miRNAs zu einem Gen-Cluster zusammengefasst (LAGOS-QUINTANA et al., 2001; LAU et al., 2001; UL HUSSAIN, 2012).

Nachfolgend wird die miRNA-Biogenese bei Säugetieren detailliert beschrieben (Abbildung 1). Die miRNA-Biogenese bei Wirbellosen verläuft unter Verwendung homologer Proteine ähnlich, während sie bei Pflanzen deutliche Unterschiede im Ablauf aufweist (LANDTHALER et al., 2004; AXTELL et al., 2011).

Die im Zellkern stattfindende Transkription wird durch eine RNA-Polymerase II (LEE et al., 2004), seltener durch eine RNA-Polymerase III realisiert (BORCHERT et al., 2006). Es entsteht ein bis zu mehrere tausend Nukleotide (nt) langes Transkript, das als primäre miRNA (primary miRNA, pri-miRNA) bezeichnet wird (LEE et al., 2002; CAI et al., 2004). Dieses besitzt in der Regel eine Kopfkappe (7-Methylguanosin Cap) am 5'-Ende sowie einen Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende (CAI et al., 2004; LEE et al., 2004). Außerdem lagert sich das Transkript zu einer Schleifenstruktur mit einem ca. 33 Basenpaaren langen, imperfekt gepaarten Stamm mit langen flankierenden Sequenzen

zusammen (HAN et al., 2006). Bei geclusterten Genen entsteht üblicherweise ein polycistronisches pri-miRNA-Transkript (LAU et al., 2001; LEE et al., 2002; CAI et al., 2004).

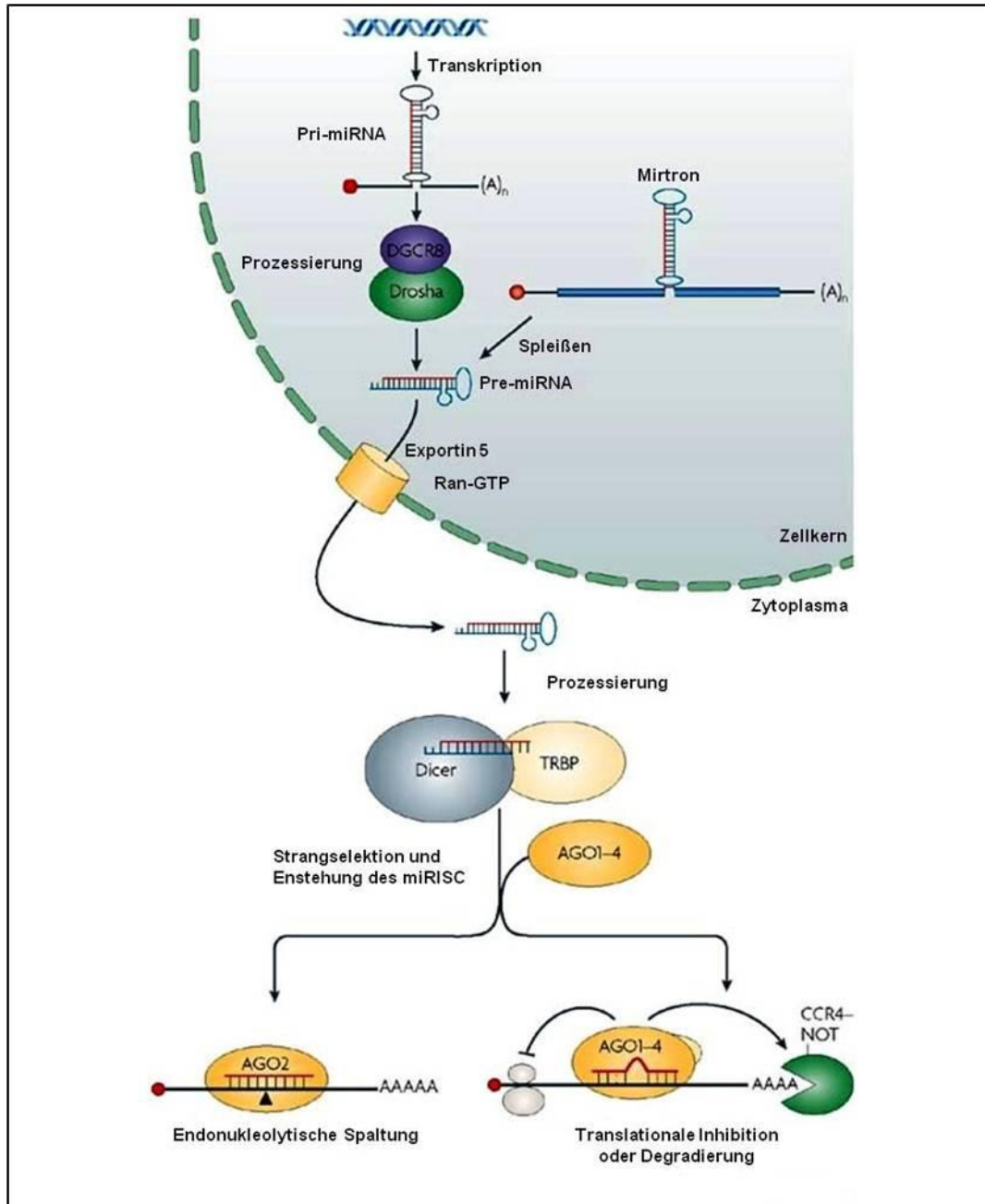


Abbildung 1: Schematische Darstellung der microRNA-Biogenese beim Säugetier (modifiziert nach FILIPOWICZ und Mitarbeitern, 2008)

AGO1-4: Proteine der Argonaut-Familie, CCR4-NOT: ein Deadenylase-Komplex, DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, miRISC: miRNA-induced silencing complex, Pre-miRNA: Vorläufer-microRNA, Pri-miRNA: primäre microRNA, Ran-GTP: Ran-Guanin Triphosphatase, TRBP: human immunodeficiency virus-1 transactivating response RNA binding protein.

Die pri-miRNA wird noch im Zellkern zu einer ca. 70 nt langen, haarnadelartigen Vorläufer-miRNA (precursor-miRNA, pre-miRNA) prozessiert (LEE et al., 2002; LEE et al., 2003). Dies wird durch die RNase III Drosha bewerkstelligt, die im sog. Mikroprozessor-Komplex zusammen mit dem Doppelstrang-RNA-bindenden Protein DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) vorliegt (LEE et al., 2003; DENLI et al., 2004; GREGORY et al., 2004; HAN et al., 2004; LANDTHALER et al., 2004). DGCR8 ist hierbei für die Bindung der pri-miRNA und die Markierung der Schnittstelle für Drosha essentiell, welche den Stamm elf Basenpaare von der Vereinigungsstelle der beiden Einzelstränge entfernt spaltet (HAN et al., 2006). Das entstandene Doppelstrangende der haarnadelartigen pre-miRNA bildet das eine Ende des späteren miRNA/miRNA*-Duplex und weist die für eine Spaltung durch eine RNase III Endonuklease typischen Eigenschaften auf, eine Phosphatgruppe am 5'-Ende und eine OH-Gruppe sowie einen ca. 2 nt langen Überhang am 3'-Ende (BASYUK et al., 2003; LEE et al., 2003). Das andere Ende des miRNA/miRNA*-Doppelstrangs entsteht in einem nachfolgenden Schritt außerhalb des Zellkerns. Hierzu wird die pre-miRNA durch Exportin 5 in der Gegenwart des Cofaktors Ran-GTP (Ran-Guanin Triphosphatase) ins Zytoplasma der Zelle exportiert (YI et al., 2003; BOHNSACK et al., 2004; LUND et al., 2004).

Im Zytoplasma erfolgt die Spaltung der pre-miRNA zu einer ca. 22 nt langen, doppelsträngigen maturen miRNA, dem miRNA/miRNA*-Duplex, durch die RNase III Endonuklease Dicer (HUTVAGNER et al., 2001; LEE et al., 2002). Die Piwi-Argonaut-Zwille-Domäne (PAZ-Domäne) von Dicer erkennt hierbei den 3'-Überhang der pre-miRNA, welche nachfolgend durch die beiden das Reaktionszentrum bildenden RNase-III-Domänen gespalten wird (ZHANG et al., 2004). Das entstehende Ende des miRNA/miRNA*-Duplex weist ebenso wie das durch Drosha prozessierte Ende einen ca. 2 nt langen Überhang am 3'-Ende auf (ZHANG et al., 2004). Dicer liegt während der Spaltung in einem ca. 500 kDa großen Komplex zusammen mit den beiden Doppelstrang-RNA-bindenden Proteinen TRBP (human immunodeficiency virus (HIV)-1 transactivating response (TAR) RNA binding protein) und PACT (protein kinase R (PKR) activating protein) sowie einem Protein der Argonaut-Familie (AGO-Protein) vor (CHENDRIMADA et al., 2005; GREGORY et al., 2005; HAASE et al., 2005; LEE et al., 2006). Dieser Multiprotein-Komplex ist dabei nicht nur für die

Spaltung der pre-miRNA durch Dicer verantwortlich, sondern stellt auch die Ausgangsbasis für die Entstehung und Funktion des miRNA-Effektorkomplexes, des sog. miRISC (miRNA-induced silencing complex), dar und wird deshalb auch als „miRISC-loading complex“ bezeichnet (CHENDRIMADA et al., 2005; GREGORY et al., 2005; MANIATAKI & MOURELATOS, 2005; LEE et al., 2006; UL HUSSAIN, 2012). Der miRISC ist ein miRNA-Ribonukleoprotein-Komplex (miRNP), der über den Abbau der Ziel-mRNA oder die Hemmung der Translation für die miRNA-vermittelte Inhibition der Genexpression verantwortlich ist (FILIPOWICZ et al., 2008; UL HUSSAIN, 2012). Er enthält als Schlüsselkomponenten den funktionellen miRNA-Strang sowie Proteine der AGO- und der GW182-Familie (glycine-tryptophan protein of 182 kDa) (MEISTER et al., 2004; EULALIO et al., 2008; UL HUSSAIN, 2012). Bisher wurden im miRISC von Säugetieren vier verschiedene AGO-Proteine (AGO1 bis AGO4) nachgewiesen, die alle an der Unterdrückung der Translation beteiligt sein können. Allerdings weist von diesen nur AGO2 eine endonukleolytische Aktivität auf (MEISTER et al., 2004; UL HUSSAIN, 2012).

Nachdem das miRNA/miRNA*-Duplex durch Dicer gebildet und anschließend entwunden wurde, wird der funktionelle Strang selektiert und auf das im miRISC enthaltene AGO-Protein übertragen (GREGORY et al., 2005; MANIATAKI & MOURELATOS, 2005). Die Entscheidung, welcher Strang als funktioneller Strang erkannt wird, hängt dabei vor allem von den thermodynamischen Eigenschaften der asymmetrischen Doppelstrang-RNA ab. Der Strang mit der geringeren internen Stabilität am 5'-Ende (guide strand, miRNA) bleibt bevorzugt im miRISC inkorporiert, während der andere Strang (passenger strand, miRNA*) freigesetzt und degradiert wird (KHVOROVA et al., 2003; SCHWARZ et al., 2003). Allerdings kann auch der miRNA*-Strang, wenn auch in selteneren Fällen, im miRISC verbleiben und regulatorische Aktivität ausüben (OKAMURA et al., 2008). Weder die Spaltung der pre-miRNA noch der Zusammenbau des miRISC oder dessen Funktion sind dabei ATP-abhängig (GREGORY et al., 2005; MANIATAKI & MOURELATOS, 2005). Abbildung 2 stellt die Entstehung eines miRISC sowie seinen Wirkmechanismus bei perfekter Basenpaarung zwischen miRNA und ihrer Ziel-mRNA schematisch dar.

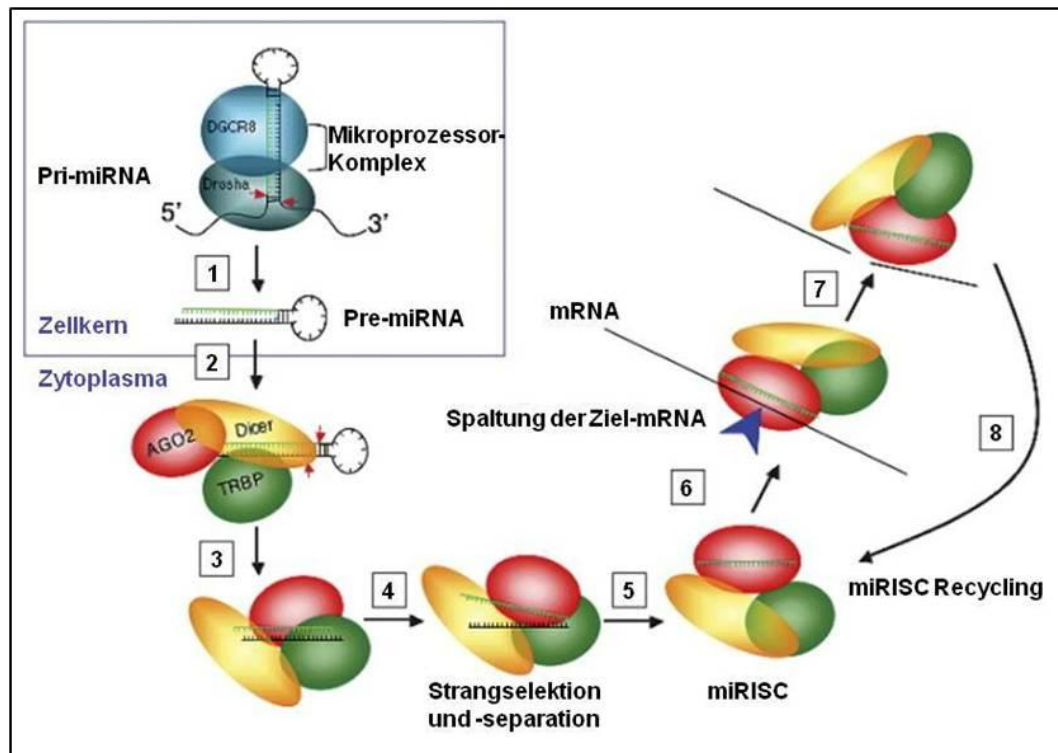


Abbildung 2: Entstehung des miRISC und AGO2-abhängige Degradierung der Ziel-mRNA (modifiziert nach GREGORY und Mitarbeitern, 2005)

(1) Spaltung der pri-miRNA zur pre-miRNA durch den Mikroprozessor-Komplex Drosha/DGCR8. (2) Ran-GTP abhängiger Export der pre-miRNA ins Zytoplasma durch Exportin 5 und Entstehung des „miRISC-loading complex“. (3) Spaltung der pre-miRNA durch Dicer und Entstehung des miRISC. (4) Entwinden des miRNA/miRNA*-Duplex und Identifizierung des funktionellen Strangs. (5) Übertragung des funktionellen Strangs innerhalb des miRISC auf AGO2. (6) Interaktion der miRNA mit der Ziel-mRNA durch Basenpaarung. (7) Endonukleolytische Spaltung der Ziel-mRNA durch AGO2 bei perfekter Komplementarität zwischen miRNA und Ziel-mRNA. (8) miRISC Recycling. AGO2: Protein der Argonaut-Familie, DGCR8: DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8, miRISC: miRNA-induced silencing complex, miRNA: microRNA, mRNA: messenger RNA, pre-miRNA: Vorläufer-microRNA, pri-miRNA: primäre microRNA, Ran-GTP: Ran-Guanin Triphosphatase, TRBP: human immunodeficiency virus-1 transactivating response RNA binding protein.

Obwohl die meisten miRNAs durch diesen klassischen Weg generiert werden, sind in jüngster Vergangenheit auch andere Biogenese-Wege entdeckt worden (WESTHOLM & LAI, 2011; OKAMURA, 2012). Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass durch Spleißen von kurzen Introns sog. „mirtrons“ gebildet werden. Hierbei wandelt ein „lariat-debranching“-Enzym nach dem Spleißen das RNA-Molekül in eine lineare, haarnadelartige Struktur um, welche der einer pre-miRNA ähnelt. Durch den Spleißvorgang entsteht das eine Ende des späteren miRNA/miRNA*-Duplex, so dass mirtrons unter Umgehung des Drosha/DGCR8-Schrittes in den miRNA-Biogeneseweg eingeschleust werden

können (Abbildung 1) (OKAMURA et al., 2007; RUBY et al., 2007; SIBLEY et al., 2012). Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass miRNAs mit bestimmter Sekundärstruktur unabhängig von Dicer durch die katalytische Aktivität von AGO2 prozessiert werden (CIFUENTES et al., 2010).

5. Funktion der microRNAs

MiRNAs vermitteln ihre üblicherweise repressiven Effekte auf die Genexpression, indem sie durch Basenpaarung an ihre Ziel-mRNA binden. Voraussetzung hierfür ist die Inkorporation der einsträngigen maturen miRNA in den miRISC, wodurch dieser in die Lage versetzt wird, mit der 3'-UTR, seltener der 5'-UTR oder dem offenen Leseraster (ORF), der Ziel-mRNA zu interagieren (LYTLE et al., 2007; OROM et al., 2008; ZHOU et al., 2009). Für die korrekte Identifizierung der Ziel-mRNA ist eine perfekt-komplementäre Basenpaarung zwischen dieser und der Seed-Region der miRNA entscheidend. Die Seed-Region besteht aus den Nukleotiden 2 - 8 ausgehend vom 5'-Ende der miRNA und weist den höchsten Grad an Konservierung auf (LEWIS et al., 2003; LEWIS et al., 2005; BARTEL, 2009). Inzwischen sind allerdings auch miRNA/mRNA-Paarungen mit imperfekter Komplementarität in der Seed-Region gefunden worden (DIDIANO & HOBERT, 2006).

Die Regulation der Genexpression kann anschließend auf verschiedenen Wegen erfolgen. Das Schicksal der Ziel-mRNA hängt dabei entscheidend von der Komplementarität der beiden Interaktionspartner außerhalb der Seed-Region sowie der biologischen Aktivität des im miRISC integrierten AGO-Proteins ab. Wenn die Basenpaarung zwischen miRNA und Ziel-mRNA perfekt-komplementär ist und der miRISC das eine Endonuklease-Aktivität aufweisende AGO2 enthält, wird die mRNA sequenzunabhängig gespalten (HUTVAGNER & ZAMORE, 2002; LLAVE et al., 2002; ZENG et al., 2003; MEISTER et al., 2004; YEKTA et al., 2004). Dies ist der primäre Mechanismus in Pflanzen (RHOADES et al., 2002). Eine imperfekte Komplementarität, wie sie in der Regel im Tierreich vorkommt, führt dagegen zu einer Inhibition der Translation und/oder einer AGO2-unabhängigen exonukleolytischen Degradierung der Ziel-mRNA. Bisher konnten die genauen Mechanismen der translationalen Inhibition bei imperfekter Basenpaarung nicht vollständig aufgeklärt werden (RHOADES et al., 2002; SEGGERSON et al., 2002; BAGGA et al., 2005; LIM et al., 2005; PILLAI et al.,

2005; FILIPOWICZ et al., 2008; CARTHEW & SONTHEIMER, 2009; UL HUSSAIN, 2012). Dagegen ist inzwischen bekannt, dass miRNAs die Translation nicht nur unterdrücken, sondern auch aktivieren können (VASUDEVAN et al., 2007; OROM et al., 2008).

6. Nachweis von microRNAs

Computer-basierte Methoden werden häufig zum Auffinden von potentiellen miRNA-Strukturen innerhalb des Genoms verwendet. Ihr definitiver Nachweis erfolgt dann über experimentelle Verfahren (HUANG et al., 2011b). Um einen Überblick über die Expression und Regulation der miRNAs eines Gewebes zu erhalten, werden Hochdurchsatzverfahren wie miRNA-Microarrays oder Next-Generation-Sequencing-Techniken eingesetzt. Die so gewonnenen Daten müssen allerdings durch miRNA-spezifische Methoden wie der Reversen-Transkription-quantitativen-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion oder dem Northern Blot bestätigt werden. In Geweben kommt zusätzlich die In-situ-Hybridisierung zum Einsatz (VAN ROOIJ, 2011).

6.1. MicroRNA-Microarrays

Die miRNA-Microarray-Technologie basiert auf der Hybridisierung zwischen markierten miRNAs und den zu ihnen komplementären Oligonukleotid-Sonden, die auf einem Glasträger fixiert sind. Die Fluoreszenzsignale können entsprechend lokalisiert, quantifiziert und einer speziellen miRNA zugeordnet werden (LI & RUAN, 2009; HUANG et al., 2011b). MiRNA-Microarrays gehören zu den Hochdurchsatzverfahren und eignen sich, um eine große Anzahl von miRNAs parallel in einer einzigen Probe nachzuweisen (QAVI et al., 2010; VAN ROOIJ, 2011). Sie benötigen nur geringe Mengen an eingesetzter Gesamt-RNA und weisen eine exzellente technische Reproduzierbarkeit auf (YENDAMURI & KRATZKE, 2011). Bei entsprechender Sondenherstellung können sowohl mature als auch pre-miRNAs, jedoch keine unbekannten miRNAs detektiert werden, da die miRNA-Sequenzen zur Herstellung der Oligonukleotid-Sonden bekannt sein müssen (QAVI et al., 2010; VAN ROOIJ, 2011). Schwierigkeiten können bei der Detektion von niedrig exprimierten miRNAs sowie bei der Abgrenzung von miRNAs entstehen, die sich nur in einer Nukleinsäure unterscheiden (YANG et al., 2011). MiRNA-Microarrays werden hauptsächlich zur Beurteilung der

relativen Expressionsänderung zwischen verschiedenen Proben eingesetzt (QAVI et al., 2010; VAN ROOIJ, 2011).

6.2. Next-Generation-Sequencing

Der Begriff Next-Generation-Sequencing (NGS) oder auch Deep-Sequencing fasst methodisch unterschiedliche Technologien zusammen, die eine Massen-Parallelsequenzierung von miRNAs nach vorangehender Amplifikation erlauben. NGS-Verfahren weisen im Vergleich zu miRNA-Microarrays eine höhere Sensitivität auf. Desweiteren können sie unbekannte miRNAs sowie miRNAs mit niedrigen Expressionsleveln nachweisen und miRNAs mit fast identischen Sequenzen unterscheiden. NGS-Verfahren weisen einen großen Dynamikbereich auf und messen absolute Häufigkeiten. Jedoch müssen große Mengen an Gesamt-RNA eingesetzt werden, und die Verfahren sind noch vergleichsweise teuer. Außerdem ist die bioinformatische Auswertung der Resultate sowie ihre korrekte Bewertung aufgrund der Generierung sehr großer Datenmengen bei diesen Verfahren nicht einfach (HUANG et al., 2011b; VAN ROOIJ, 2011; YENDAMURI & KRATZKE, 2011).

6.3. Reverse-Transkription-quantitative-Real-Time-PCR

Die Reverse-Transkription-quantitative-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) ist das am häufigsten eingesetzte Verfahren, um Resultate aus Hochdurchsatzverfahren zu bestätigen. Nach Extraktion der Gesamt-RNA wird diese mittels reverser Transkription (RT) in cDNA umgeschrieben. Hierfür werden entweder universelle oder miRNA-spezifische RT-Primer verwendet. Der Einsatz von universellen Primern ist insbesondere für den parallelen Nachweis verschiedener miRNAs aus einem kleinen Probenvolumen geeignet. MiRNA-spezifische Primer liegen entweder in haarnadelartiger (stem-loop) oder linearer Form vor. Stem-loop-Primer sind zwar schwieriger in ihrer Herstellung, haben aber den Vorteil, dass ihre Struktur das Annealing des Primers mit pre- und pri-miRNAs verhindert und hierdurch die Spezifität im Vergleich zu linearen Primern erhöht wird (BENES & CASTOLDI, 2010; QAVI et al., 2010; VAN ROOIJ, 2011).

In der nachfolgenden qPCR kommen der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I oder sog. TaqMan-Sonden zum Nachweis von miRNAs zum Einsatz. Da SYBR Green I auch nicht-spezifische, doppelsträngige PCR-

Produkte, wie beispielsweise Primer-Dimere, bindet, ist die Durchführung einer Schmelzkurvenanalyse zur Sicherstellung der Spezifität der Amplifikationsprodukte notwendig. TaqMan-Sonden besitzen einen Quencher und einen Reporter-Fluoreszenzfarbstoff und hybridisieren während des qPCR-Zyklus mit ihrem komplementären Strang. Durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase kommt es zu einem schrittweisen Abbau der Sonde, wodurch der Reporter vom Quencher räumlich getrennt wird und die Fluoreszenz nachgewiesen werden kann. Diese Methode weist eine hohe Spezifität auf, ist aber auch entsprechend teuer (BENES & CASTOLDI, 2010). Die relative Quantifizierung der miRNAs erfolgt über die delta-delta-quantification-cycle-Methode ($\Delta\Delta C_q$ -Methode) (PFAFFL et al., 2002). Die RT-qPCR ist schnell und sensitiv, weist einen großen Dynamikbereich auf, benötigt wenig Ausgangsmaterial und kann auch niedrig exprimierte miRNAs sicher nachweisen. Die größte Schwachstelle der RT-qPCR besteht aktuell im Mangel an validierten Referenzgenen und in der Uneinigkeit über die zu verwendende Normalisierungsmethode (BENES & CASTOLDI, 2010; YENDAMURI & KRATZKE, 2011). Desweiteren kann eine Kreuzhybridisierung zwischen paralogen miRNAs nicht ausgeschlossen werden (VAN ROOIJ, 2011).

6.4. Weitere Nachweismethoden

Northern Blot und In-situ-Hybridisierung können ebenfalls zum Nachweis von miRNAs verwendet werden, kommen aber seltener zum Einsatz. Der methodische Ablauf beider Verfahren ist analog zum Vorgehen beim Nachweis von mRNAs. Der Northern Blot liefert Informationen über die Größe der miRNAs und kann zwischen maturen miRNAs und pre-miRNAs differenzieren. Er ist allerdings zeitaufwendig und benötigt große Mengen an eingesetzter Gesamt-RNA. Die In-situ-Hybridisierung wird zur Darstellung der spatio-temporalen Expression einer miRNA auf (sub)zellulärer Ebene und in Geweben verwendet. Beide Verfahren sind zum Screening ungeeignet (QAVI et al., 2010; HUANG et al., 2011b; VAN ROOIJ, 2011).

7. MicroRNAs und Diabetes mellitus Typ 2

MiRNAs sind an vielen regulatorischen Vorgängen beteiligt, die in direktem Zusammenhang mit der Pathogenese des Diabetes mellitus stehen. Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Organogenese der pankreatischen Inselzellen,

der Insulinproduktion und -sekretion der β -Zellen, der Entstehung der Insulinresistenz sowie der Adipogenese und beim Lipidstoffwechsel (PANDEY et al., 2009; DEHWAH et al., 2012; SHANTIKUMAR et al., 2012; MAO et al., 2013).

7.1. Rolle im endokrinen Pankreas und in der β -Zell-Dysfunktion

MiR-375 wird in den Langerhans-Inseln sehr stark exprimiert und steuert zusammen mit zahlreichen weiteren miRNAs (z. B. miR-7 und miR-124a2) die embryonale Entwicklung der pankreatischen Inselzellen (BAROUKH et al., 2007; KLOOSTERMAN et al., 2007; JOGLEKAR et al., 2009). Diese miRNA ist außerdem an der Regulation der Glukose-stimulierten Insulinsekretion (GSIS) und -genexpression der β -Zellen sowie am Erhalt der normalen α - und β -Zell-Masse beteiligt. Im Jahr 2004 konnten POY und Mitarbeiter erstmals zeigen, dass miR-375 in der murinen β -Zelllinie MIN6 eine Herunterregulation seines Targets Myotrophin (Mtpn) bewirkt. Mtpn ist in die Insulinexozytose involviert, so dass eine verstärkte Expression von miR-375 eine verminderte GSIS zur Folge hatte (POY et al., 2004; XIA et al., 2011).

In einer weiteren Studie konnten EL OUAAMARI und Mitarbeiter (2008) zeigen, dass in der Insulinoma-Zelllinie INS-1E erhöhte miR-375-Konzentrationen zu einer Herunterregulation der 3'-Phosphoinositid-abhängigen Proteinkinase-1 (PDK1), einem Schlüsselenzym des Phosphatidylinositol-3-Kinase-(PI3K)-Signalwegs, führen. Hierdurch kommt es letztendlich zu einer verminderten Glukose-stimulierten Insulingenexpression. Desweiteren wurde in dieser Zelllinie sowie in Inselzellen der Ratte der Zusammenhang zwischen einer Hyperglykämie und der miR-375-Expression untersucht. Erhöhte Glukosekonzentrationen führten zu einer reduzierten Expression von miR-375-Vorläufermolekülen und über PDK1 zu einer erhöhten Insulingenexpression. Erwartungsgemäß konnten verminderte miR-375-Konzentrationen auch in den Inselzellen diabetischer Goto-Kakizaki-Ratten (GK-Ratten) im Vergleich zu normoglykämischen Wistar-Kontrolltieren gefunden werden (EL OUAAMARI et al., 2008).

Umgekehrt konnten POY und Mitarbeiter (2009) zeigen, dass normalgewichtige miR-375-Knockout-Mäuse (375KO) infolge des Verlustes dieser miRNA eine chronische Hyperglykämie entwickeln. Die Hyperglykämie war dabei primär auf eine erhöhte α -Zell-Zahl mit nachfolgender Hyperglukagonämie, gesteigerter

hepatischer Glukoneogenese sowie verstärkter Abgabe von Glukose ins Blut zurückzuführen. Dagegen wurde die moderate Reduktion der β -Zell-Zahl infolge einer verminderten Proliferation als nicht ursächlich für die Hyperglykämie angesehen, insbesondere da sich die Plasmainsulinkonzentrationen unverändert darstellten und auch keine Insulinresistenz zu beobachten war (POY et al., 2009).

Obese Leptin-Knockout-Mäuse (*ob/ob*), die ein Modell für eine erhöhte β -Zell-Masse infolge ausgeprägter Insulinresistenz darstellen, zeigten eine erhöhte Expression von miR-375. Wurde bei diesen Mäusen jedoch eine genetische Depletion von miR-375 durchgeführt, entwickelten die Tiere (*375/ob*) einen Diabetes. Dies konnte durch eine verminderte Proliferationskapazität des endokrinen Pankreas mit Abnahme der β -Zell-Masse und -Zahl und entsprechender Reduktion der Plasmainsulinkonzentrationen erklärt werden (POY et al., 2009).

Unklar ist jedoch, wie die Forschungsergebnisse von ZHAO und Mitarbeitern (2010) einzuordnen sind. Im Gegensatz zu der verminderten Expression von miR-375 in diabetischen Tiermodellen wiesen Inselzellen von humanen T2DM-Patienten erhöhte miR-375-Konzentrationen auf. Die verstärkte Expression dieser miRNA war mit der Ablagerung von Amyloid und einer verminderten β -Zell-Masse assoziiert (ZHAO et al., 2010). MiR-375 ist auf eine sehr komplexe Weise in die Glukosehomöostase involviert, und es sind weitere Studien nötig, um die bisher gewonnen Erkenntnisse zu vervollständigen und sie in ihrer Gesamtheit zu verstehen.

Neben den bisher erwähnten miRNAs nehmen weitere miRNAs Einfluss auf die Insulinsekretion, in dem sie die Expression von Proteinen verändern, die an der Insulinexozytose beteiligt sind. Für miR-9, miR-34a und miR-124a konnten bereits die direkten und indirekten Targets ermittelt werden. Obwohl diese miRNAs unterschiedliche Proteine reprimieren, bewirkt ihre verstärkte Expression in allen Fällen eine verminderte GSIS (PLAISANCE et al., 2006; LOVIS et al., 2008a; LOVIS et al., 2008b). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in Inselzellen diabetischer Leptinrezeptor-Knockout Mäuse (*db/db*) eine verstärkte Expression von miR-34a im Vergleich zu Kontrolltieren gefunden werden (LOVIS et al., 2008b).

Eine Hyperglykämie führt zu einem veränderten miRNA-Expressionsmuster der β -Zellen, wobei viele der durch Glukose regulierten miRNAs ihrerseits wieder den Insulinmetabolismus beeinflussen. Bei Inkubation der β -Zelllinie MIN6 mit hohen Glukosekonzentrationen konnte eine verstärkte Expression von 50 miRNAs gefunden werden, darunter miR-30d, miR-103, miR-107, miR-132 und miR-212. Dagegen war eine verminderte Expression lediglich für elf miRNAs nachzuweisen (TANG et al., 2009). Eine durch Glukose induzierte Erhöhung von miR-30d konnte auch in pankreatischen Inselzellen der Maus gezeigt werden. MiR-30d wirkt hierbei über die Herunterregulation ihres direkten Targets, der Mitogen-aktivierten-Protein-4-Kinase-4 (Map4k4), sowie indirekt über die Erhöhung von MafA, einem β -Zell-spezifischen Transkriptionsfaktor. Als Folge kommt es zu einer erhöhten Glukose-stimulierten Insulingentranskription (TANG et al., 2009; ZHAO et al., 2012). Diese physiologische Gegenregulation scheint jedoch bei Vorliegen eines Diabetes mellitus nicht zu funktionieren, da in Inselzellen von Leptinrezeptor-Knockout-Mäusen (*db/db*) mit manifestem Diabetes mellitus eine verminderte Expression von miR-30d bei erhöhten Map4k4-Konzentrationen gefunden wurde (ZHAO et al., 2012).

Eine veränderte Expression von 30 Inselzell-miRNAs konnte in hyperglykämischen GK-Ratten im Vergleich zu normoglykämischen Wistar-Kontrolltieren nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass vier dieser miRNAs (miR-130a, miR-132, miR-212 und miR-335) durch Hyperglykämie reguliert werden und dass miR-335 durch Herunterregulation des Syntaxin-bindenden-Proteins-1 (Stxbp1) zu einer beeinträchtigten GSIS führt (ESGUERRA et al., 2011). Auch miR-15a gehört zu den durch Glukose regulierten miRNAs. Eine kurzfristige Erhöhung der Blutglukose führte in Inselzellen der Maus zu einer verstärkten Expression dieser miRNA. Die Erhöhung von miR-15a ging in MIN6-Zellen mit einer gesteigerten Insulinbiosynthese einher, die über die Herunterregulation des endogenen Uncoupling-Proteins-2 (UCP2) vermittelt wurde. Dagegen kam es bei langfristiger Hyperglykämie zu einer verminderten miR-15a-Konzentration und somit einer reduzierten Insulinbiosynthese (SUN et al., 2011).

Allerdings wird nicht nur die miRNA-Expression der β -Zellen, sondern auch die der insulinabhängigen Gewebe durch das Vorliegen einer Hyperglykämie beeinflusst. Die Untersuchung von Rattenstämmen mit verschiedenen

glykämischen Zuständen zeigte, dass miR-222 und miR-27a im Fettgewebe sowie miR-195 und miR-103 in der Leber im hyperglykämischen Zustand verstärkt exprimiert werden, während die Konzentration von miR-10b im Skelettmuskel bei Hyperglykämie reduziert ist (HERRERA et al., 2010).

7.2. Rolle bei der Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe

Einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese des T2DM stellt die Insulinresistenz der insulinabhängigen Gewebe (Leber, Fettgewebe und Skelettmuskulatur) dar. Zu Beginn wird die Insulinresistenz über eine vermehrte Insulinbereitstellung kompensiert. Können die β -Zellen den Insulinbedarf jedoch nicht mehr decken, kommt es zur chronischen Hyperglykämie und letztendlich zur Entstehung eines T2DM (KOLFSCHOTEN et al., 2009; GUAY et al., 2011). Auch an der Entstehung der Insulinresistenz sind miRNAs entscheidend beteiligt.

LING und Mitarbeiter (2009) inkubierten 3T3-L1-Adipozyten mit hohen Glukose- und Insulinmengen. Die entstandenen insulinresistenten Adipozyten wiesen ein deutlich verändertes miRNA-Expressionsmuster im Vergleich zu insulinsensitiven auf. MiR-320 zeigte dabei eine mehr als 50-fach erhöhte Expression. Eine Hemmung dieser miRNA bewirkte über mehrere Zwischenschritte eine Erhöhung der Anzahl der GLUT4-Transporter. Dies führte zu einer Steigerung der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme in die Zelle und einer Verbesserung der bestehenden Insulinresistenz (LING et al., 2009).

HE und Mitarbeiter (2007) berichteten, dass bei diabetischen GK-Ratten die drei Paraloge von miR-29 – nämlich miR-29a, miR-29b und miR-29c – in allen drei insulinabhängigen Geweben vermehrt exprimiert werden. In 3T3-L1-Adipozyten führte die verstärkte Expression dieser miRNAs zu einer reduzierten Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme. Dies kann mit einer Insulinresistenz gleichgesetzt werden (HE et al., 2007). Auch miR-181a bewirkt über die Herunterregulation seines direkten Targets Sirtuin-1 (SIRT1) eine Beeinträchtigung der Insulinwirkung mit nachfolgender Insulinresistenz. Eine verstärkte Expression von miR-181a konnte nicht nur in einer Insulin-resistenten Hepatozyten-Zelllinie, sondern auch im Lebergewebe von Diät-induzierten obesen sowie diabetischen Mäusen und im Serum diabetischer Patienten gefunden werden (ZHOU et al., 2012).

In einer Studie konnte auch eine verstärkte Expression von miR-143 und miR-145 in der Leber von genetisch- sowie Diät-induzierten obesen Mausmodellen nachgewiesen werden. MiR-143 führt in der Leber zu einer Verminderung des Oxysterol-binding-protein-related-Protein-8 (ORP8), infolgedessen die Insulin-stimulierte Aktivierung der Proteinkinase B (AKT) gehemmt wird. Durch die reduzierte AKT-Aktivität kommt es zu einer Beeinträchtigung der Glukosetoleranz mit Entwicklung einer Insulinresistenz, ohne dass Veränderungen in der β -Zell-Funktion zu beobachten sind (JORDAN et al., 2011; ONO, 2011). Die beiden miRNAs miR-103 und miR-107 zeigen ebenfalls eine erhöhte Expression in der Leber von obesen Mäusen. Sie agieren über ihr direktes Target Caveolin-1, einem wichtigen Regulator des Insulinrezeptors, und führen hierdurch zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz und Insulinsensitivität (TRAJKOVSKI et al., 2011).

7.3. Rolle als Biomarker beim Diabetes mellitus Typ 2

Feline diabetische Patienten werden in der Regel erst in einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium diagnostiziert (NELSON, 2003; RAND, 2009; OSTO et al., 2013). Aber auch bei vielen humanen T2DM-Patienten wird die Diagnose oft erst beim Auftreten von Komplikationen gestellt (GUARIGUATA, 2012). Biomarker zur frühzeitigen Diagnose des T2DM sowie seiner Begleiterkrankungen oder zur genauen Einschätzung des Status der β -Zellen sowie der Insulinresistenz wären somit in beiden Spezies von großem Wert, auch in Hinblick auf Therapie und Prognose (BAROUKH et al., 2007; GALLAGHER et al., 2010; ZAMPETAKI et al., 2010).

Bei diabetischen GK-Ratten konnten unterschiedliche miRNA-Expressionsmuster in den Inselzellen des Pankreas sowie in den insulinabhängigen Geweben im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren identifiziert werden (HE et al., 2007; HERRERA et al., 2009; HUANG et al., 2009; HERRERA et al., 2010; ESGUERRA et al., 2011). Beim Menschen wurde eine veränderte Expression zahlreicher miRNAs im Fettgewebe von T2DM-Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen gefunden (KLÖTING et al., 2009). Im humanen Skelettmuskel konnten GALLAGHER und Mitarbeiter (2010) ca. 170 miRNAs nachweisen, von denen 62 eine veränderte Expression bei T2DM-Patienten aufwiesen. Wiederum 15 % dieser miRNAs zeigten bereits zu Beginn des Diabetes eine veränderte Expression (GALLAGHER et al., 2010).

Im Hinblick auf die Entwicklung von Biomarkern erscheinen Expressionsprofile zirkulierender miRNAs allerdings geeigneter, da die Gewinnung von Serum, im Gegensatz zur Entnahme von Gewebeproben, oft Teil der Routinediagnostik ist. Im Jahr 2008 wurde erstmals über abweichende miRNA-Expressionsmuster im Serum diabetischer Menschen berichtet (CHEN et al., 2008). Inzwischen konnte im Serum neu-diagnostizierter Diabetiker eine verstärkte Expression von sieben miRNAs im Vergleich zu T2DM-verdächtigen Menschen mit normaler Glukosetoleranz gefunden werden. Fünf dieser sieben miRNAs waren auch im Vergleich zu Prädiabetikern mit beeinträchtigter Glukosetoleranz und/oder erhöhter Nüchternglukose verstärkt exprimiert. Die miRNA-Expressionsprofile zwischen den T2DM-verdächtigen Menschen und den Prädiabetikern zeigten dagegen keine Unterschiede (KONG et al., 2011).

KAROLINA und Mitarbeiter (2011) konnten veränderte miRNA-Expressionsmuster in Blut- und Gewebeproben (Pankreas, Fettgewebe, Leber und Skelettmuskulatur) eines T2DM-Rattenmodells sowie in Blutproben von humanen diabetischen Patienten nachweisen. Sie identifizierten acht miRNAs, die eine Unterscheidung zwischen Patienten mit erhöhter Nüchternglukose und Typ-2-Diabetikern erlaubten. Diese miRNAs könnten somit eine miRNA-Signatur zur Abgrenzung der unterschiedlichen Phasen innerhalb der Diabetesprogression darstellen (KAROLINA et al., 2011).

In einer Studie von ZAMPETAKI und Mitarbeitern (2010) wurde der Verlauf von miRNA-Expressionsmustern in humanem Plasma über einen Zeitraum von zehn Jahren untersucht. Während dieser Zeit entwickelten einige der ursprünglich gesunden Studienteilnehmer einen klinisch-manifesten T2DM. Im Vergleich zu gesunden Individuen wiesen bei diesen Menschen einige miRNAs bereits eine veränderte Expression auf, lange bevor der T2DM klinisch-manifest wurde. Auf Grundlage dieser Ergebnisse entwickelten die Autoren ein Modell aus fünf miRNAs, das klinisch-manifeste Diabetiker in 70 % der Fälle und gesunde Individuen in 92 % der Fälle korrekt klassifizieren konnte. Falsch gruppierte Diabetiker wiesen dabei deutlich niedrigere Nüchternglukosekonzentrationen oder einen sehr gut kontrollierten Diabetes auf. Interessanterweise klassifizierte dieses Modell auch 52 % der normoglykämischen Menschen, die im Verlauf der Studie einen T2DM entwickelten, bereits im Voraus als Diabetiker. Darüber hinaus konnte während der Diabetesprogression (von Patienten mit normaler

Glukosetoleranz über Patienten mit beeinträchtigter Glukosetoleranz/erhöhter Nüchternglukose bis hin zu klinisch-manifesten Diabetikern) ein stetiger Abfall der Plasmakonzentration von miR-126 beobachtet werden (ZAMPETAKI et al., 2010).

In einer weiteren Studie wurde im Serum von T2DM-Patienten eine erhöhte Expression von miR-181a gefunden. In einem Mausmodell ging die Erhöhung dieser miRNA mit einer beeinträchtigten hepatischen Insulinsensitivität einher. MiR-181a könnte daher auch beim Menschen einen diagnostischen Biomarker für Insulinresistenz darstellen (ZHOU et al., 2012).

III. PUBLIKATION

1. Published Article

Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats

Stefanie N. Fleischhacker^a

Stefan Bauersachs, Dr. rer. nat.^b

Astrid Wehner, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)^a

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)^a

Karin Weber, Dr. med. vet.^a

^a Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Germany

^b Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Germany

The Veterinary Journal (2013)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027> (published online before print)

ARTICLE IN PRESS

The Veterinary Journal xxx (2013) xxx–xxx



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvj

Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats ☆

Stefanie N. Fleischhacker ^a, Stefan Bauersachs ^b, Astrid Wehner ^a, Katrin Hartmann ^a, Karin Weber ^{a,*}^a Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, Ludwig Maximilian University Munich, Veterinärstrasse 13, 80539 Munich, Germany^b Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, Ludwig Maximilian University Munich, Feodor Lynen Strasse 25, 81377 Munich, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 25 March 2013

Available online xxxx

Keywords:

Diabetes mellitus
Feline
MicroRNA

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) regulate gene expression and play a role in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. This study investigated whether miRNA expression profiles differ between healthy and diabetic cats. Total RNA was extracted from sera of healthy lean cats, newly diagnosed diabetic cats and cats in diabetic remission. Microarrays representing 1079 mouse miRNA targets were used to measure miRNA expression in serum samples from eight healthy lean and seven newly diagnosed diabetic cats; 227 distinct miRNAs could be detected. Nineteen miRNAs were differentially expressed in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats, with a false discovery rate of 10%. Hierarchical cluster analysis of these 19 miRNAs grouped healthy lean and newly diagnosed diabetic cats into separate clusters. After correction for multiple testing, only miR-122 and miR-193b reached statistical significance ($P < 0.05$), with a false discovery rate of 1%. Specific quantitative real-time PCR assays for three target miRNAs (miR-122, miR-193b and miR-483*) were applied to four samples from each of the three groups. miR-122 expression was >40-fold higher in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats and cats in diabetic remission, whereas miR-193b showed >14-fold higher expression. miR-483* was expressed sixfold higher in newly diagnosed diabetic cats compared to both other groups.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Diabetes mellitus (DM) is one of the most common metabolic disorders in humans and cats. In cats, 0.5–2% of the population are diabetic (Lederer et al., 2009) and the majority of cats develop type 2 diabetes mellitus (T2DM), which is characterised by inappropriate insulin secretion and/or insulin resistance of insulin target tissues. If treatment is provided in the early stages of disease, diabetic remission can be achieved (Marshall et al., 2009).

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous, short, non-coding RNAs that negatively regulate gene expression at the post-transcriptional level. They are found in almost all tissues and body fluids, and a high stability in serum has been reported (Lagos-Quintana et al., 2002; Chen et al., 2008). miRNAs have been associated with the development of T2DM by affecting glucose homeostasis, insulin secretion, insulin gene expression, maintenance of normal pancreatic α - and β -cell mass and insulin signalling in insulin-sensitive tissues (Dehwal et al., 2012).

Circulating miRNAs are potential diagnostic and prognostic biomarkers and have been used as a sensitive, non-invasive diagnostic

tool for early disease detection in human malignancies (Chen et al., 2012; Kanamaru et al., 2011; Anindo and Yaqinuddin, 2012). In diabetic rats and humans, changes in miRNA expression have been detected in blood samples, pancreatic islets and insulin-sensitive tissues (Karolina et al., 2011; Kong et al., 2011). Expression of miRNAs is altered at different stages of diabetes progression (Gallagher et al., 2010; Zampetaki et al., 2010; Karolina et al., 2011). The availability of blood-based biomarkers to diagnose T2DM before clinical signs appear, to assess β -cell function or to predict disease progress would be beneficial for feline diabetes therapy and prognosis.

The aims of this study were to investigate whether the diabetic state of cats is reflected in serum miRNA expression profiles. Expression of three miRNAs was determined in the serum of newly diagnosed diabetic cats, healthy cats and cats in diabetic remission.

Materials and methods

Animals

Serum samples were collected from 20 privately owned cats presented to the Clinic of Small Animal Medicine of the Ludwig Maximilian University Munich, Germany. These animals were classified as either healthy lean ($n = 8$), diabetic ($n = 8$) or diabetic in remission ($n = 4$). Cats were considered to be healthy when history, complete physical examination, complete blood count and serum biochemistry revealed no abnormal findings. Healthy cats were presented to the clinic for annual health checks. Cats were classified as lean if their body condition score was 3–5 on a 9–

☆ Preliminary results were presented at the American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) 2012 ACVIM Forum, New Orleans, Louisiana, USA, 30 May to 2 June 2012.

* Corresponding author. Tel.: +49 89 21801672.

E-mail address: karin.weber@lmu.de (K. Weber).

ARTICLE IN PRESS

2

S.N. Fleischhacker et al. / The Veterinary Journal xxx (2013) xxx–xxx

Table 1

Clinical characteristics of cats included in different groups.

	Healthy lean	Newly diagnosed diabetic	Diabetic in remission
<i>n</i>	8	8	4
Sex (<i>n</i>)			
Male	2	5	3
Female	6	3	1
Breed (<i>n</i>)			
European shorthair	3	7	2
British shorthair	–	–	2
Maine Coon	4	–	–
Siberian forest cat	–	1	–
Turkish Angora	1	–	–
Age (years)			
Range	5.00–15.00	3.00–14.75	6.00–13.00
Median	12.25	11.50	9.63
Mean \pm SD	10.84 \pm 3.50	11.06 \pm 3.61	9.56 \pm 3.00
Weight (kg)			
Range	4.10–6.00	2.90–7.50	5.05–6.90
Median	4.64	4.60	5.75
Mean \pm SD	4.89 \pm 0.68	4.98 \pm 1.50	5.86 \pm 0.77
Body condition score (points ^a)			
Range	3.00–5.00	2.00–7.50	6.00–7.50
Median	4.50	5.50	6.50
Mean \pm SD	4.38 \pm 0.74	4.75 \pm 2.14	6.63 \pm 0.75
Blood glucose (mmol/L)			
Range	3.81–7.08	16.00–54.55	4.83–6.10
Median	4.84	24.81	5.76
Mean \pm SD	5.17 \pm 1.36	28.81 \pm 13.31	5.61 \pm 0.56
Diabetes-associated diseases (<i>n</i>)			
Hepatic lipidosis	–	6	–
Diabetic ketoacidosis	–	5	–
Pancreatitis	–	4	–
Cholangitis	–	1	–
Bacterial cystitis	–	1	–
Mild, non-diabetes-associated diseases (<i>n</i>)			
Hypertrophic cardiomyopathy	–	–	1

SD, standard deviation.

^a Nine-point scale with 1 = emaciated; 9 = obese.

point scale (1 = emaciated; 9 = obese; Table 1). For diabetic cats, a complete physical examination, complete blood count and serum biochemistry were performed at the time of blood collection.

Diabetic cats were newly diagnosed at the time of presentation and had not received prior treatment. DM diagnosis was based on clinical signs, fasting hyperglycaemia, elevated serum fructosamine concentrations and glucosuria. Diabetic cats in remission had been treated with insulin for 2–9 months and remained normoglycaemic for at least 2 weeks after insulin administration was discontinued. The diabetic remission state was regularly controlled for at least 2 months. Of diabetic cats in remission, one cat was treated with ramipril due to mild hypertrophic cardiomyopathy.

Diabetic cats with diabetes-associated or mild, non-diabetes-associated, concurrent diseases were included and consecutively enrolled (Table 1). Diabetic cats with moderate to severe non-diabetes-associated concurrent diseases were excluded. Since age is known to influence miRNA expression, age-matching of all groups was performed (median of all 20 cats 11.4 years, range 3–15 years; Table 1).

Sample processing and RNA extraction from serum

Blood samples (2 mL) were allowed to clot and serum was processed within 1 h after blood collection by centrifugation at 2500 g for 5 min and stored at -20°C until further analysis. Total RNA (138–432 ng), including miRNA, was extracted from 400 μL serum from eight healthy lean and seven newly diagnosed diabetic cats using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). Samples were evaluated for quality and quantity using the NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Thermo Fisher Scientific). Total RNA was stored at -80°C until further analysis.

MicroRNA microarrays and data analysis

miRNA expression profiling was performed on serum samples of eight healthy lean and eight newly diagnosed diabetic cats. RNA samples were labelled using the miRNA Labeling and Hyb Kit (Agilent Technologies) according to the manufacturer's protocol with minor modifications and hybridised to custom 8x60K miRNA micro-

arrays (Agilent) containing 1079 mouse miRNAs (miRBase v.17), each of them represented by 40 features (see Appendix A: Supplementary data). Scanning was performed with the Agilent Technologies Scanner G2505C. Agilent's Feature Extraction Software version 10.7.3.1 was used to quantify signal intensities. A feature was listed as detectable if >50% of the signals in at least one of the two groups were above the detection limit ('well above background' flag = 1) and a probe was considered to be detectable if >50% of the replicated features were detectable. All miRNA microarray data of this study are 'Minimum Information About a Microarray Experiment' (MIAME)-compliant (Brazma et al., 2001) and have been deposited in the National Center for Biotechnology Information (NCBI)'s Gene Expression Omnibus (GEO) Database.¹ The data are accessible through GEO accession number GSE37177.

Reverse transcription

Total RNA was extracted from serum samples of healthy lean, newly diagnosed diabetic cats and cats in diabetic remission ($n = 4$ each) and reverse transcribed to cDNA using the miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) (see Appendix A: Supplementary data).

Quantitative real-time PCR

To confirm the miRNA microarray results, three target miRNAs (mmu-miR-122, mmu-miR-193b, mmu-miR-483*) and two small nuclear RNAs (snRNAs) (hs_RNU1A_1, hs_RNU6B_2) were selected for quantitative real-time PCR (qPCR) validation. Mouse specific primer assays for all target and reference genes were purchased from Qiagen (catalogue numbers MS00024010, MS00011368, MS00008022, MS00013986 and MS00014000). qPCR was performed on an Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Life Technologies) using the miScript SYBR Green

¹ See: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>.

ARTICLE IN PRESS

S.N. Fleischhacker et al./The Veterinary Journal xxx (2013) xxx–xxx

3

PCR Kit (Qiagen). Melting curve analyses were performed to validate the specific generation of the expected PCR products (see Appendix A: Supplementary data). Data were analysed using the 7500 System Software (Applied Biosystems).

Fixed input volumes were used for RNA extraction (400 µL), reverse transcription (RT) (5 µL) and qPCR (2 µL) reactions, and RT-qPCR results were normalised using RNU1A_1 and RNU6B_2 as references. Both snRNAs were pre-validated to generate single PCR products in feline serum and have been successfully used for normalisation in human plasma samples (Ng et al., 2009; Yaman Agaoglu et al., 2011).

Statistical analysis

miRNA microarray expression data (mean expression values of detectable probes) were normalised using the BioConductor package Variance Stabilization Normalization (VSN), which uses affine transformation and variance-stabilising generalised log₂ transformation to remove systematic array biases and to make variance independent of the mean intensity (Huber et al., 2002). Statistical analysis was performed on the level of detectable probes using the 'limma' package. Correction for multiple testing was performed using Limma decideTests (equivalent to the Benjamini–Hochberg method to control the false discovery rate) and adjusted *P* values <0.05 were considered to be statistically significant (Smyth, 2004). Relative expression values (VSN normalised value of a sample – mean of VSN values of all samples) of miRNAs with a nominal *P* value <0.01 (before correction for multiple testing) were used for explorative hierarchical cluster analysis. Hierarchical cluster analysis was performed using Multi Experiment Viewer 4.7.3 (Saeed et al., 2003).

Statistical analyses of RT-qPCR data to determine miRNA expression differences between the distinct groups and between males and females were performed with Relative Expression Software Tool (REST) 2009 V2.0.13 (Pfaffl et al., 2002). The levels of expression of RNU1A_1 and RNU6B_2 were comparable between the groups and both were used as references for normalization of expression. *P* values <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

Clinical data

Characteristics of the cats are summarised in Table 1. Of 20 cats included in the study, 12 (60%) were crossbred (European short-hair) and 8 (40%) were purebred (Maine Coon, British shorthair, Siberian forest cat, Turkish Angora). Of 20 cats, 10 (50%) cats were spayed female and 10 (50%) were neutered male. Among the eight newly diagnosed diabetic cats, five (63%) had diabetic ketoacidosis (DKA) at the time of blood collection. Hepatic lipidosis was diagnosed in all DKA cats, pancreatitis in three and cholangitis and bacterial cystitis each in one DKA cats. One cat in diabetic remission had mild hypertrophic cardiomyopathy (Table 1).

miRNA profile in feline serum

miRNA microarray expression profiles were determined for serum samples from eight healthy lean and seven newly diagnosed diabetic cats. Of the 1079 miRNAs on the microarray, 227 miRNAs were detectable (see Appendix A: Supplementary Table 1). miR-122 and miR-193b were upregulated in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats after correction for multiple testing (adjusted *P* values <0.05). All miRNAs with nominal *P* values <0.01 (before correction for multiple testing) are shown in Table 2. Relative expression values of the miRNAs listed in Table 2 were used for hierarchical cluster analysis. On the basis of these 19 miRNAs, healthy lean cats and newly diagnosed diabetic cats were clearly divided into two groups with distinct miRNA profiles (Fig. 1).

Validation by reverse transcriptase qPCR

Three miRNAs (miR-122, miR-193b and miR-483*) were selected to validate the results of the microarray by RT-qPCR using serum samples from healthy lean cats (*n* = 4), newly diagnosed diabetic cats (*n* = 4) and cats in diabetic remission (*n* = 4). Melting curve analyses confirmed that all primers were specific for their respective transcript. No PCR products were generated in the neg-

Table 2
MicroRNA expression ratios and microarray data.

Systematic name	Expression ratio	Nominal <i>P</i> value	Adjusted <i>P</i> value
mmu-miR-122	45.5	<0.001	0.003
mmu-miR-193b	10.2	<0.001	0.007
mmu-miR-1892	–3.1	0.001	0.069
mmu-miR-23a*	–2.4	0.001	0.069
mmu-miR-1894-3p	–2.1	0.002	0.077
mmu-miR-378b	4.1	0.003	0.078
mmu-miR-351*	–2.9	0.003	0.085
mmu-miR-3085-5p	–2.3	0.003	0.085
mmu-miR-344f-3p	–5.0	0.003	0.085
mmu-miR-1971	–2.2	0.003	0.089
mmu-miR-1896	–1.8	0.004	0.089
mmu-miR-139-3p	1.8	0.005	0.093
mmu-miR-375	2.3	0.006	0.094
mmu-miR-483*	2.2	0.006	0.095
mmu-miR-129-2-3p	2.8	0.006	0.095
mmu-miR-1907	–1.9	0.007	0.098
mmu-miR-598*	–2.6	0.009	0.103
mmu-miR-3474	–2.7	0.009	0.105
mmu-miR-1188	–1.7	0.009	0.107

Nineteen microRNAs with differential expression were detected by microarrays (nominal *P* values <0.01, false discovery rate 10%) in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats. Adjusted *P* values <0.05 are considered to be statistically significant. Expression ratio between newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats.

ative controls. RNU1A_1 and RNU6B_2 were detectable in all serum samples, with high levels of expression of RNU1A_1 (mean quantification cycle, C_q value 16.3) and low levels of expression of RNU6B_2 (mean C_q value 27.4) in all groups (see Appendix A: Supplementary Table 2). There was no significant difference in levels of expression levels of these snRNAs between groups. miR-122 was upregulated ~100-fold in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats and ~40-fold in newly diagnosed diabetic cats compared to cats in diabetic remission. miR-193b was upregulated ~20-fold in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats and ~14-fold in newly diagnosed diabetic cats compared to cats in diabetic remission (Table 2; Fig. 2; see Appendix A: Supplementary Table 3). miR-483* was upregulated ~six-fold in newly diagnosed diabetic cats compared to both healthy lean cats and cats in diabetic remission. Sex did not influence the expression levels of miR-122, miR-193b or miR-483* (*P* > 0.05).

Discussion

There are few studies of miRNA expression in the serum of domestic animals (Chen et al., 2008; Mizuno et al., 2011). This study demonstrated that miRNA profiling is feasible in cats using a small sample volume that can be easily obtained in a clinical setting. Since the sequences of most miRNAs are highly conserved (Lagos-Quintana et al., 2002; Ibanez-Ventoso et al., 2008), methods for detection of human or rodent miRNAs may be used in domestic animals (Barrey et al., 2010; Jin et al., 2010; Zhu et al., 2010). Boggs et al. (2008) demonstrated that canine and human mature miRNAs were 100% homologous. High sequence identities among vertebrates have been reported for miR-193b (Unno et al., 2009). In the present study, the murine precursor and mature miRNA sequences of miR-122, miR-193b and miR-483* were tested for homology with the feline genome using ENSEMBL² and sequence identities from 90% to 100% were found. Therefore, miRNA microarrays and RT-qPCR primer assays designed for the detection of mouse miRNAs were used. Nevertheless, it cannot be excluded that

² See: <http://www.ensembl.org/index.html>.

ARTICLE IN PRESS

4

S.N. Fleischhacker et al./The Veterinary Journal xxx (2013) xxx-xxx

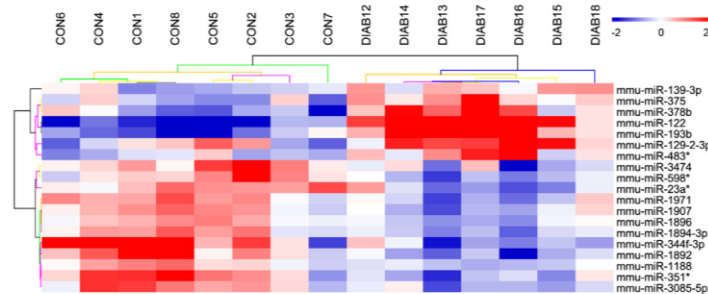


Fig. 1. Hierarchical cluster analysis of miRNA expression in serum of healthy lean and newly diagnosed diabetic cats based on 19 miRNAs with a nominal P value <0.01 . Each row represents an individual miRNA and each column represents an individual serum sample. CON1-8, serum samples of healthy lean cats; DIAB12-18, serum samples of newly diagnosed diabetic cats. Serum samples are arranged based on the similarity of their miRNA expression profile. Blue and red colours indicate low and high relative miRNA expression levels (mean-centred VSN-normalised values), respectively. The sample support tree is at the top and the miRNA support tree on the left. The sample support tree shows that healthy lean and newly diagnosed diabetic cats were clearly grouped into separate clusters based on the similarity of their miRNA expression profiles. The reliability of the support tree branching is represented by colours: black 100%; grey 90–100%; blue 80–90%; green 70–80%; yellow 60–70%; orange 50–60%; pink 0–50%; red 0%.

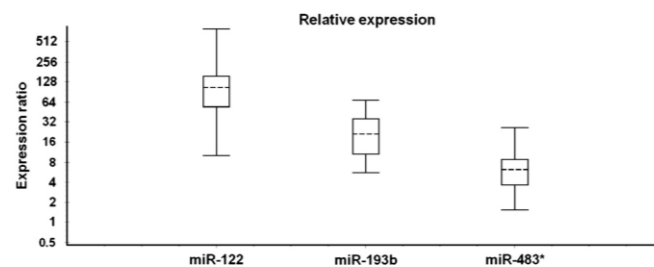


Fig. 2. Whisker-box plot showing the expression ratios of miR-122, miR-193b and miR-483* for newly diagnosed diabetic cats (sample group) compared to healthy lean cats (control group). The expression levels of the three illustrated miRNAs were measured by reverse transcriptase quantitative real-time PCR. Data were normalised to the small nuclear RNAs RNU1A_1 and RNU6B_2 and statistically analysed using the REST software. The expression ratio indicates the mean factor by which the miRNA expression in the sample group is upregulated in comparison to that of the control group. The box area encompasses 50% of all observations, the dashed line represents the sample median and the whiskers represent the outer 50% of observations. All three illustrated miRNAs are statistically significantly upregulated in serum of newly diagnosed diabetic cats.

some feline specific miRNAs were not detected due to a lack of homology of these miRNAs between mice and cats.

Of the 1079 miRNA targets on the array, approximately a quarter of the analysed miRNAs was detectable in feline serum. This is in agreement with studies using serum samples of humans or different mice strains, in which up to 154 or 277 miRNAs were detected, respectively (Chen et al., 2008; Ji et al., 2011; Mi et al., 2012). miRNAs play an important role in insulin secretion, insulin resistance, pancreatic development, adipogenesis and lipid metabolism in humans (Pandey et al., 2009). Altered miRNA expression patterns in serum have been described in patients with DM (Chen et al., 2008; Kong et al., 2011). In our study, healthy lean and newly diagnosed diabetic cats could be distinguished by hierarchical cluster analysis based on the expression of 19 miRNAs with nominal P values <0.01 . Nevertheless, using expression data before correction for multiple testing runs the risk of including false positive results, and further studies with larger group sizes are required to confirm the presented data. miR-375 is upregulated in humans with T2DM (Kong et al., 2011), in agreement with our findings in newly diagnosed feline diabetic patients. Confirmation by qPCR was not possible in our study, since the mouse assay for this miRNA did not yield reliable results with feline serum. miR-375 is abundant in pancreatic islets and suppresses glucose-induced insulin secretion when overexpressed (Pandey et al., 2009; Poy et al., 2009). In newly diagnosed diabetic cats, high expression of miR-375 may contribute to impaired insulin secretion.

In this study, miR-122 displayed the largest difference between healthy lean and newly diagnosed diabetic cats, with ~ 100 -fold higher expression in serum samples of newly diagnosed diabetic cats. This miRNA is highly expressed in the liver and the sequence of the mature miRNA is conserved among all vertebrate species in which it has been examined (Jopling, 2012). In liver diseases, circulating levels of this miRNA are typically increased, while liver tissue levels are decreased (Wang et al., 2009). Since miR-122 is highly liver-specific, the observed increase of miR-122 in the serum of newly diagnosed diabetic cats might be the result of hepatocyte damage related to DKA or hepatic lipidosis. However, circulating miRNAs are also actively secreted by intact hepatocytes (Vickers and Remaley, 2012).

Expression of miR-193b was ~ 20 -fold higher in newly diagnosed diabetic cats than healthy cats. miR-193b acts as a tumor suppressor and inhibits cell proliferation, migration and invasion (Xu et al., 2010). Some of the predicted mRNA-targets of miR-193b are transcription factors that exhibit lower expression in pancreatic islets isolated from humans with T2DM or have been linked to endocrine pancreatic development, survival and function (Guntton et al., 2005; Caramuta et al., 2010). The cellular origin and the role of miR-193b in feline diabetes mellitus are uncertain, but this miRNA may be related to transcription factors that are vital for islet cell function and survival.

The miRNA miR-483* was also upregulated in newly diagnosed diabetic cats. miR-483 is an anti-apoptotic oncogene (Veronese

ARTICLE IN PRESS

S.N. Fleischhacker et al. / The Veterinary Journal xxx (2013) xxx–xxx

5

et al., 2010). In a rat model of maternal protein restriction and in low birth weight humans, miR-483-3p expression was upregulated ~twofold in adipose tissue (Ferland-McCollough et al., 2012). In newly diagnosed diabetic cats, high levels of miR-483* might be connected to insulin resistance or metabolic changes in adipose tissue, but further studies are required to uncover a possible role of this miRNA in the pathogenesis of diabetes mellitus.

Diabetic cats in remission are in a subclinical diabetic state in which they display no clinical signs of DM but in which the insulin secretory capacity of β -cells may be compromised. MiRNA expression adapts quickly to changes in metabolic conditions (Granjon et al., 2009). Therefore, a change in the expression of miRNAs that are altered in T2DM can be expected if diabetic cats achieve remission. In this study, the upregulation of miR-122, miR-193b and miR-483* detected in newly diagnosed diabetic cats could not be detected in diabetic cats in remission. These miRNAs might be interesting targets to follow during the transition of diabetic cats into remission.

The limitations of this pilot study were the small group sizes and the heterogeneity in clinical parameters. Our groups were large enough to result in unambiguous separation of healthy lean and newly diagnosed diabetic cats using hierarchical cluster analysis. In addition, targets that exhibited large differences between groups by microarray analysis could be validated by qPCR. An effect of breed on miRNA expression may exist, but the slight breed imbalances among the groups are unlikely to have influenced miRNA expression to such a large degree as was found in this study. Further investigations with larger group sizes are required to confirm the described changes of miRNA expression in newly diagnosed diabetic cats.

In addition, the results obtained in this study are not sufficient to determine if the upregulated miRNAs in newly diagnosed diabetic cats are causally involved in feline T2DM pathogenesis or if they merely display secondary effects owing to the ketoacidotic or hyperglycaemic state or other concurrent diseases. Therefore, identification of target genes would be desirable to unravel the exact role of the upregulated miRNAs in the pathogenesis of feline T2DM.

Conclusions

This study investigated miRNA expression in the serum of healthy and diabetic cats. Small volumes of serum samples yield sufficient material to permit miRNA expression profiling in cats. More than 200 miRNAs could be detected by miRNA microarray and newly diagnosed diabetic cats exhibited an altered miRNA expression profile. The upregulation of several miRNA targets is specific to diabetic cats and is not detected in cats in diabetic remission. Further studies are required to uncover the involvement of miRNAs in feline T2DM pathogenesis.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgement

The authors wish to thank Mrs. Anastazia Samborski for excellent technical assistance with the miRNA microarrays.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>.

References

- Anindo, M.I., Yaqinuddin, A., 2012. Insights into the potential use of microRNAs as biomarker in cancer. *International Journal of Surgery* 10, 443–449.
- Barrey, E., Bonnamy, B., Barrey, E.J., Mata, X., Chaffaux, S., Guerin, G., 2010. Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Veterinary Journal* Suppl. 38, 303–310.
- Boggs, R.M., Wright, Z.M., Stickney, M.J., Porter, W.W., Murphy, K.E., 2008. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mammalian Genome* 19, 561–569.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansoorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., et al., 2001. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nature Genetics* 29, 365–371.
- Caramuta, S., Eghazi, S., Rodolfo, M., Witten, D., Hansson, J., Larsson, C., Lui, W.O., 2010. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *Journal of Investigative Dermatology* 130, 2062–2070.
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Zen, K., Zhang, C.Y., 2008. Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* 18, 997–1006.
- Chen, X., Hu, Z., Wang, W., Ba, Y., Ma, L., Zhang, C., Wang, C., Ren, Z., Zhao, Y., Wu, S., Zhuang, R., Zhang, Y., Hu, H., Liu, C., Xu, L., Wang, J., Shen, H., Zhang, J., Zen, K., Zhang, C.Y., 2012. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis. *International Journal of Cancer* 130, 1620–1628.
- Dehwh, M.A., Xu, A., Huang, Q., 2012. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *Journal of Genetics and Genomics* 39, 11–18.
- Ferland-McCollough, D., Fernandez-Twinn, D.S., Cannell, I.G., David, H., Warner, M., Vaag, A.A., Bork-Jensen, J., Brons, C., Gant, T.W., Willis, A.E., Siddle, K., Bushell, M., Ozanne, S.E., 2012. Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell Death and Differentiation* 19, 1003–1012.
- Gallagher, I.J., Scheele, C., Keller, P., Nielsen, A.R., Remenyi, J., Fischer, C.P., Roder, K., Babraj, J., Wahlestedt, C., Hutvagner, G., Pedersen, B.K., Timmons, J.A., 2010. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Medicine* 2, 9.
- Granjon, A., Gustin, M.P., Rieusset, J., Lefai, E., Meugnier, E., Guller, I., Cerutti, C., Paultre, C., Disse, E., Rabasa-Lhoret, R., Laville, M., Vidal, H., Rome, S., 2009. The microRNA signature in response to insulin reveals its implication in the transcriptional action of insulin in human skeletal muscle and the role of a sterol regulatory element-binding protein-1c/myocyte enhancer factor 2C pathway. *Diabetes* 58, 2555–2564.
- Gunton, J.E., Kulkarni, R.N., Yim, S., Okada, T., Hawthorne, W.J., Tseng, Y.H., Robertson, R.S., Ricordi, C., O'Connell, P.J., Gonzalez, F.J., Kahn, C.R., 2005. Loss of ARNT/HIF1 β mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 122, 337–349.
- Huber, W., von Heydebreck, A., Sultmann, H., Poustka, A., Vingron, M., 2002. Variance stabilization applied to microarray data calibration and to the quantification of differential expression. *Bioinformatics* 18, S96–S104.
- Ibanez-Ventoso, C., Vora, M., Driscoll, M., 2008. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS ONE* 3, e2818.
- Ji, F., Yang, B., Peng, X., Ding, H., You, H., Tien, P., 2011. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *Journal of Viral Hepatitis* 18, e242–e251.
- Jin, W., Dodson, M.V., Moore, S.S., Basarab, J.A., Guan, L.L., 2010. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: A potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Molecular Biology* 11, 29.
- Jopling, C., 2012. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biology* 9, 137–142.
- Kanamaru, H., Fukushima, S., Yamashita, J., Honda, N., Oyama, R., Kakimoto, A., Masuguchi, S., Ishihara, T., Inoue, Y., Jinnin, M., Ihn, H., 2011. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *Journal of Dermatological Science* 61, 187–193.
- Karolina, D.S., Armugam, A., Tavintharan, S., Wong, M.T., Lim, S.C., Sum, C.F., Jayaseelan, K., 2011. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS ONE* 6, e22839.
- Kong, L., Zhu, J., Han, W., Jiang, X., Xu, M., Zhao, Y., Dong, Q., Pang, Z., Guan, Q., Gao, L., Zhao, J., Zhao, L., 2011. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: A clinical study. *Acta Diabetologica* 48, 61–69.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., Tuschke, T., 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current Biology* 12, 735–739.

Please cite this article in press as: Fleischhacker, S.N., et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats. *The Veterinary Journal* (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

ARTICLE IN PRESS

6

S.N. Fleischhacker et al./The Veterinary Journal xxx (2013) xxx–xxx

- Lederer, R., Rand, J.S., Jonsson, N.N., Hughes, I.P., Morton, J.M., 2009. Frequency of feline diabetes mellitus and breed predisposition in domestic cats in Australia. *The Veterinary Journal* 179, 254–258.
- Marshall, R.D., Rand, J.S., Morton, J.M., 2009. Treatment of newly diagnosed diabetic cats with glargine insulin improves glycaemic control and results in higher probability of remission than protamine zinc and lente insulins. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 11, 683–691.
- Mi, Q.S., Weiland, M., Qi, R.Q., Gao, X.H., Poisson, L.M., Zhou, L., 2012. Identification of mouse serum miRNA endogenous references by global gene expression profiles. *PLoS ONE* 7, e31278.
- Mizuno, H., Nakamura, A., Aoki, Y., Ito, N., Kishi, S., Yamamoto, K., Sekiguchi, M., Takeda, S., Hashido, K., 2011. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: Promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS ONE* 6, e18388.
- Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C., Ng, S.S., Sung, J.J., 2009. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 58, 1375–1381.
- Pandey, A.K., Agarwal, P., Kaur, K., Datta, M., 2009. MicroRNAs in diabetes: Tiny players in big disease. *Cellular Physiology and Biochemistry* 23, 221–232.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, e36.
- Poy, M.N., Hausser, J., Trajkovski, M., Braun, M., Collins, S., Rorsman, P., Zavolan, M., Stoffel, M., 2009. MiR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 5813–5818.
- Saeed, A.I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., Braisted, J., Klapa, M., Currier, T., Thiagarajan, M., Sturn, A., Snuffin, M., Rezantsev, A., Popov, D., Ryltsov, A., Kostukovich, E., Borisovsky, I., Liu, Z., Vinsavich, A., Trush, V., Quackenbush, J., 2003. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis. *BioTechniques* 34, 374–378.
- Smyth, G.K., 2004. Linear models and empirical Bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Statistical Applications in Genetics and Molecular Biology* 3, Article 3.
- Unno, K., Zhou, Y., Zimmerman, T., Platanias, L.C., Wickrema, A., 2009. Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leukemia and Lymphoma* 50, 1865–1871.
- Veronese, A., Lupini, L., Consiglio, J., Visone, R., Ferracin, M., Fornari, F., Zanesi, N., Alder, H., D'Elia, G., Gramantieri, L., Bolondi, L., Lanza, G., Querzoli, P., Angioni, A., Croce, C.M., Negrini, M., 2010. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Research* 70, 3140–3149.
- Vickers, K.C., Remaley, A.T., 2012. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Current Opinion in Lipidology* 23, 91–97.
- Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L.E., Galas, D.J., 2009. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 4402–4407.
- Xu, C., Liu, S., Fu, H., Li, S., Tie, Y., Zhu, J., Xing, R., Jin, Y., Sun, Z., Zheng, X., 2010. MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *European Journal of Cancer* 46, 2828–2836.
- Yaman Agaoglu, F., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N., Gezer, U., 2011. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biology* 32, 583–588.
- Zampetaki, A., Kiechl, S., Drozdov, I., Willeit, P., Mayr, U., Prokopi, M., Mayr, A., Weger, S., Oberhollenzer, F., Bonora, E., Shah, A., Willeit, J., Mayr, M., 2010. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circulation Research* 107, 810–817.
- Zhu, Z., He, J., Jia, X., Jiang, J., Bai, R., Yu, X., Lv, L., Fan, R., He, X., Geng, J., You, R., Dong, Y., Qiao, D., Lee, K.B., Smith, G.W., Dong, C., 2010. MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domestic Animal Endocrinology* 38, 200–209.

2. Published Supplementary Data

Online published supplementary data associated with the article:

Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats

Stefanie N. Fleischhacker^a

Stefan Bauersachs, Dr. rer. nat.^b

Astrid Wehner, Dr. med. vet., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)^a

Katrin Hartmann, Prof., Dr. med. vet., Dr. med. vet. habil., Dipl. ECVIM-CA (Internal Medicine)^a

Karin Weber, Dr. med. vet.^a

^a Centre for Clinical Veterinary Medicine, Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Germany

^b Laboratory for Functional Genome Analysis (LAFUGA), Gene Center, LMU Munich, Germany

The Veterinary Journal (2013)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

Online published supplementary data associated with the article
Fleischhacker, S.N., et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats.
The Veterinary Journal (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

Appendix A: Supplementary data

Supplementary materials and methods

MicroRNA microarrays

Total RNA from each sample was dephosphorylated with calf intestinal alkaline phosphatase. Samples were heat denatured in the presence of dimethyl sulphoxide, ligated with cyanine 3-cytidine biphosphate and purified using Micro Bio-Spin Chromatography Columns (Bio-Rad). Labelled samples were hybridised at 55 °C for 20 h to 8x60K microRNA microarrays (Agilent), then washed in GE Wash Buffer 1 and 2 (Agilent).

Reverse transcription

Each reverse transcription (RT) reaction contained 1x miScript RT Buffer, 1 µL miScript Reverse Transcriptase Mix, 10 µL RNase-free water and 5 µL total RNA. RT reactions were performed on an Eppendorf Mastercycler ep gradient S (Eppendorf) at 37 °C for 60 min and at 95 °C for 5 min. Negative controls containing total RNA and RT buffer without reverse transcriptase were included (no RT controls). Reaction products were diluted with 20 µL RNase-free water and the cDNA was stored at -80 °C until further analysis.

Quantitative real-time PCR

Each amplification reaction of quantitative real-time PCR was performed in a final volume of 20 µL containing 1x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1x miScript Universal Primer, 1x miScript Primer Assay, 2 µL cDNA and 4 µL RNase-free water. The PCR conditions were 95 °C for 15 min and 40 cycles of 94 °C for 15 s, 55 °C for 30 s and 70 °C for 35 s. Melting curve analyses were performed at 95 °C for 15 s, 60 °C for 1 min and 95 °C for 15 s (1 cycle). All PCR reactions were run in duplicate on a 96-well plate. Negative controls without RT reaction (no RT control) and without template (no template control) were also performed.

Online published supplementary data associated with the article
 Fleischhacker, S.N., et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats.
 The Veterinary Journal (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

Supplementary Table 1

MicroRNAs ($n = 227$) detected in feline serum by microRNA microarray.

mmu-let-7b	mmu-miR-1892	mmu-miR-27b	mmu-miR-344g-3p	mmu-miR-5119
mmu-let-7i	mmu-miR-1894-3p	mmu-miR-2861	mmu-miR-3472	mmu-miR-5122
mmu-miR-101a	mmu-miR-1895	mmu-miR-290-5p	mmu-miR-3473b	mmu-miR-5124
mmu-miR-101c	mmu-miR-1896	mmu-miR-292-5p	mmu-miR-3473c	mmu-miR-5126
mmu-miR-106b	mmu-miR-1897-5p	mmu-miR-296-5p	mmu-miR-3474	mmu-miR-5128
mmu-miR-107	mmu-miR-1901	mmu-miR-29a	mmu-miR-34a	mmu-miR-5130
mmu-miR-10b	mmu-miR-1904	mmu-miR-29b	mmu-miR-350*	mmu-miR-5131
mmu-miR-1187	mmu-miR-1906	mmu-miR-29c	mmu-miR-351*	mmu-miR-5132
mmu-miR-1188	mmu-miR-1907	mmu-miR-3058*	mmu-miR-361	mmu-miR-5135
mmu-miR-1198-5p	mmu-miR-192	mmu-miR-3059*	mmu-miR-365	mmu-miR-574-5p
mmu-miR-122	mmu-miR-193	mmu-miR-3065*	mmu-miR-365-1*	mmu-miR-598*
mmu-miR-1224	mmu-miR-1931	mmu-miR-3067*	mmu-miR-370	mmu-miR-652
mmu-miR-1249	mmu-miR-1934*	mmu-miR-3070a	mmu-miR-375	mmu-miR-652*
mmu-miR-125a-3p	mmu-miR-193b	mmu-miR-3072*	mmu-miR-378	mmu-miR-666-5p
mmu-miR-126-3p	mmu-miR-193b*	mmu-miR-3075	mmu-miR-378b	mmu-miR-671-3p
mmu-miR-128	mmu-miR-1940	mmu-miR-3077*	mmu-miR-3960	mmu-miR-671-5p
mmu-miR-129-1-3p	mmu-miR-1941-5p	mmu-miR-3081*	mmu-miR-3963	mmu-miR-677*
mmu-miR-129-2-3p	mmu-miR-1943	mmu-miR-3082-5p	mmu-miR-3968	mmu-miR-678
mmu-miR-1306-3p	mmu-miR-1955-3p	mmu-miR-3085-3p	mmu-miR-412-3p	mmu-miR-680
mmu-miR-130a	mmu-miR-1964-3p	mmu-miR-3085-5p	mmu-miR-423-5p	mmu-miR-691
mmu-miR-130b	mmu-miR-1966	mmu-miR-3091-5p	mmu-miR-425	mmu-miR-696
mmu-miR-133b	mmu-miR-1967	mmu-miR-3092	mmu-miR-431*	mmu-miR-705
mmu-miR-134	mmu-miR-196a	mmu-miR-3093-3p	mmu-miR-451	mmu-miR-708
mmu-miR-135a-1*	mmu-miR-196b	mmu-miR-3095-3p	mmu-miR-452-5p	mmu-miR-709
mmu-miR-135b*	mmu-miR-1971	mmu-miR-3098-5p	mmu-miR-466h-3p	mmu-miR-710
mmu-miR-138	mmu-miR-1982*	mmu-miR-3099	mmu-miR-466i-5p	mmu-miR-711
mmu-miR-138-1*	mmu-miR-19a	mmu-miR-30a	mmu-miR-466q	mmu-miR-712
mmu-miR-139-3p	mmu-miR-19b	mmu-miR-30c-2*	mmu-miR-467f	mmu-miR-714
mmu-miR-140*	mmu-miR-202-3p	mmu-miR-30d	mmu-miR-470	mmu-miR-718
mmu-miR-142-3p	mmu-miR-208a-5p	mmu-miR-30e	mmu-miR-483	mmu-miR-720
mmu-miR-142-5p	mmu-miR-20a	mmu-miR-3102*	mmu-miR-483*	mmu-miR-721
mmu-miR-144	mmu-miR-21	mmu-miR-3102-3p.2	mmu-miR-484	mmu-miR-760-3p
mmu-miR-145	mmu-miR-211*	mmu-miR-3102-5p.2	mmu-miR-490-5p	mmu-miR-760-5p
mmu-miR-146a	mmu-miR-212-3p	mmu-miR-3104-5p	mmu-miR-494	mmu-miR-762
mmu-miR-148a	mmu-miR-2137	mmu-miR-3106	mmu-miR-505-3p	mmu-miR-770-3p
mmu-miR-149*	mmu-miR-2182	mmu-miR-3107	mmu-miR-5097	mmu-miR-874
mmu-miR-150*	mmu-miR-22	mmu-miR-320	mmu-miR-5100	mmu-miR-877
mmu-miR-151-3p	mmu-miR-221	mmu-miR-324-3p	mmu-miR-5103	mmu-miR-877*
mmu-miR-15a	mmu-miR-223	mmu-miR-326	mmu-miR-5105	mmu-miR-882
mmu-miR-15b	mmu-miR-23a	mmu-miR-327	mmu-miR-5107	mmu-miR-883a-5p
mmu-miR-16	mmu-miR-23a*	mmu-miR-328	mmu-miR-5108	mmu-miR-92a
mmu-miR-181a	mmu-miR-23b	mmu-miR-328*	mmu-miR-5109	mmu-miR-92a-2*
mmu-miR-186	mmu-miR-24	mmu-miR-339-3p	mmu-miR-5110	mmu-miR-99a
mmu-miR-186*	mmu-miR-25	mmu-miR-342-3p	mmu-miR-5112	
mmu-miR-187*	mmu-miR-26a	mmu-miR-344f-3p	mmu-miR-5113	
mmu-miR-188-5p	mmu-miR-27a	mmu-miR-344f-5p	mmu-miR-5115	

Online published supplementary data associated with the article
 Fleischhacker, S.N., et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats.
 The Veterinary Journal (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

Supplementary Table 2

Reverse transcriptase quantitative real-time PCR results for target miRNAs and small nuclear RNAs.

Sample	Quantification cycle (Cq) values				
	RNU1A_1	RNU6B_2	miR-122	miR-193b	miR-483*
HL 1	17.645	28.015	37.980	31.815	35.060
HL 2	16.925	27.775	37.320	30.490	34.110
HL 3	16.920	27.610	34.800	30.365	33.510
HL 4	16.230	26.550	35.955	29.790	33.555
D 1	15.400	26.935	29.505	26.775	30.555
D 2	12.255	26.210	26.915	23.950	29.825
D 3	17.030	27.320	31.380	25.810	31.490
D 4	15.805	27.290	27.065	24.465	29.085
DR 1	15.215	26.960	35.475	29.570	33.055
DR 2	16.855	27.800	33.570	30.110	33.420
DR 3	16.625	27.230	36.310	30.965	34.990
DR 4	18.195	27.450	34.830	29.830	34.725

Cq values are mean of duplicates.

HL, Healthy lean cats; D, Newly diagnosed diabetic cats; DR, Cats in diabetic remission.

Online published supplementary data associated with the article
 Fleischhacker, S.N., et al. Differential expression of circulating microRNAs in diabetic and healthy lean cats.
 The Veterinary Journal (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.03.027>

Supplementary Table 3

Comparison of expression levels of three microRNAs between healthy lean cats, newly diagnosed diabetic cats and cats in diabetic remission using reverse transcriptase quantitative real-time PCR.

Sample group	Control group	miR-122		miR-193b		miR-483*	
		Expression ratio	<i>P</i> value	Expression ratio	<i>P</i> value	Expression ratio	<i>P</i> value
D	HL	98.3	0.005	18.2	0.000	6.2	0.001
D	DR	39.9	0.017	14.5	0.023	7.0	0.009
DR	HL	2.5	0.144	1.3	0.556	0.9	0.847

Results are normalised to two reference microRNAs using REST software.

$P < 0.05$ is considered to be statistically significant.

HL, Healthy lean cats; D, Newly diagnosed diabetic cats; DR, Cats in diabetic remission.

IV. DISKUSSION

Diabetes mellitus ist eine der häufigsten metabolischen Erkrankungen beim Menschen und nach der Hyperthyreose die zweithäufigste Endokrinopathie der Katze (REUSCH et al., 2006; WHITING et al., 2011; GUARIGUATA, 2012). Trotz jahrzehntelanger intensiver Forschung sind die zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen des Diabetes mellitus auf molekularer Ebene noch immer nicht vollständig entschlüsselt (ISMAIL-BEIGI, 2012).

Bei Katzen bleiben die klinischen Symptome wie Polyurie/Polydipsie und auch Polyphagie oft lange Zeit unentdeckt und nicht selten werden diese Katzen erst beim Tierarzt vorgestellt, wenn es zu einer lebensbedrohlichen Entgleisung des Diabetes mellitus in Form einer diabetischen Ketoazidose gekommen ist. Durch diese Problematik wird die Diagnose T2DM oft erst gestellt, wenn bereits eine irreversible Schädigung der β -Zellen eingetreten ist. Im Gegensatz zum humanen T2DM ist deshalb beim T2DM der Katze eine Insulintherapie in der Regel unvermeidbar (NELSON, 2003; RAND, 2009; OSTO et al., 2013). Eine frühzeitige Diagnose noch vor dem Auftreten von irreversiblen β -Zell-Dysfunktionen könnte die Therapie deutlich vereinfachen und ein Fortschreiten der Krankheit möglicherweise verhindern oder zumindest verzögern. Auch ein Biomarker, der die Remission eines Diabetes prognostizieren könnte, wäre von großem Wert, um Hypoglykämien infolge der Insulintherapie zu vermeiden.

Für die Spezies Mensch, Maus und Ratte wurde bereits gezeigt, dass miRNAs direkt in die Pathogenese des T2DM involviert sind und somit potentielle diagnostische Biomarker sowie Zielstrukturen für neue Therapieansätze darstellen (DEHWAH et al., 2012; SHANTIKUMAR et al., 2012; ROME, 2013). Die vorliegende Studie hatte deshalb zum Ziel, (i) eine Methode zum Nachweis zirkulierender miRNAs in felinem Serum zu entwickeln, (ii) miRNA-Expressionsmuster gesunder normalgewichtiger sowie neu-diagnostizierter diabetischer Katzen zu erstellen und (iii) potentielle Unterschiede zwischen den miRNA-Expressionsmustern gesunder normalgewichtiger Katzen, neu-diagnostizierter diabetischer Katzen und diabetischer Katzen in Remission zu bestimmen.

Trotz intensiver Forschungstätigkeiten während der letzten Dekade wurden miRNAs bisher hauptsächlich beim Menschen sowie bei den klassischen Labortieren Maus und Ratte untersucht. Studien zu miRNAs bei Haus- und Nutztieren sind dagegen nur in geringem Umfang in der wissenschaftlichen Literatur zu finden (BOGGS et al., 2007; GU et al., 2007; BOGGS et al., 2008; REDDY et al., 2009; JIN et al., 2010; ZHU et al., 2010; GIOIA et al., 2011), wobei Expressionsstudien im Serum die Ausnahme darstellen (CHEN et al., 2008; BARREY et al., 2010; MIZUNO et al., 2011; STEUDEMANN et al., 2013). In einer Sequenzierungsstudie des Katzensgenoms wurden 179 potentielle feline miRNA-Sequenzen aufgrund ihrer Homologien zu miRNA-Sequenzen anderer Spezies sowie ihrer Haarnadelstruktur identifiziert, jedoch nicht näher beschrieben (PONTIUS et al., 2007). MiRNA-Expressionsstudien bei der Katze fehlen bisher. Die vorliegende Studie zeigte daher zum ersten Mal, dass miRNAs in Katzenserum vorhanden und nachweisbar sind und dass ein miRNA-Expressionsmuster erstellt werden kann, selbst wenn nur kleine Volumina an Serum (400 µl) vorliegen. Die dafür benötigte Menge an Vollblut kann bei adulten Katzen problemlos während einer routinemäßigen Blutentnahme gewonnen werden.

Zur Erstellung globaler miRNA-Expressionsmuster werden am häufigsten miRNA-Microarrays eingesetzt, die in der Lage sind, über 1000 miRNAs gleichzeitig aus einer einzelnen Probe nachzuweisen. Die Bestätigung der miRNA-Microarray-Ergebnisse erfolgt dann üblicherweise mittels einer RT-qPCR. Beide Nachweismethoden setzen jedoch voraus, dass die zu detektierenden miRNA-Sequenzen bekannt sind. Ist dies, wie in der vorliegenden Arbeit, nicht der Fall, kann auf bekannte miRNA-Sequenzen anderer Spezies zurückgegriffen werden. Diese Vorgehensweise ist möglich, da miRNAs zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert sind (PASQUINELLI et al., 2000; LAGOS-QUINTANA et al., 2002; SONG & WANG, 2009; JOPLING, 2012). Für mehrere humane und canine mature miRNAs wurde bereits eine Sequenzübereinstimmung von 100 % nachgewiesen (BOGGS et al., 2007; BOGGS et al., 2008). Auch für miR-122 und miR-193b konnte eine hohe Homologie zwischen verschiedenen Vertebratenspezies gezeigt werden (UNNO et al., 2009; JOPLING, 2012). Zur Detektion von miRNAs in Haus- und Nutztieren werden deshalb häufig Assays eingesetzt, die für die Detektion von humanen oder

murinen miRNAs entwickelt wurden (BOGGS et al., 2007; BARREY et al., 2010; JIN et al., 2010; ZHU et al., 2010). Auch für feline miRNAs sind derzeit keine spezifischen Nachweismethoden erhältlich, so dass in der vorliegenden Studie miRNA-Microarrays und RT-qPCR-Assays der Maus verwendet wurden. Zur Bestätigung, dass die in der RT-qPCR untersuchten miRNAs zwischen Maus und Katze konserviert sind, wurde das Katzengenom nach Homologien mit den precursor und maturen miRNA-Sequenzen von mmu-miR-122, mmu-miR-193b und mmu-miR-483* unter Verwendung des Ensembl Genome Browsers (<http://www.ensembl.org>) durchsucht. Es konnten Sequenzübereinstimmungen zwischen 90,9 % und 100 % gefunden werden. Nichtsdestotrotz ist nicht auszuschließen, dass einige Katzen-spezifische miRNAs aufgrund einer fehlenden Homologie zwischen Maus und Katze nicht detektierbar waren.

Von den 1079 auf dem miRNA-Microarray enthaltenen miRNAs konnte ca. ein Viertel (227) im feline Serum nachgewiesen werden. Die Anzahl der detektierten miRNAs steht in Einklang mit den Ergebnissen von Expressionsstudien im Serum anderer Spezies. In humanen Serumproben gesunder Individuen sowie von Patienten mit Lungenkrebs, kolorektalen Tumoren oder Diabetes mellitus wurden insgesamt mehr als 180 verschiedene miRNAs gefunden (CHEN et al., 2008). Eine andere Studie identifizierte 154 unterschiedliche miRNAs im Serum von gesunden Probanden sowie mit dem Hepatitis-B-Virus infizierten Patienten (JI et al., 2011). Im Serum verschiedener Mauslinien wurden 277 miRNAs nachgewiesen (MI et al., 2012), während in Serumproben von Hunden (Dobermann Pinscher) mit dilatativer Kardiomyopathie sowie gesunden Kontrolltieren 404 miRNAs detektierbar waren (STEUDEMANN et al., 2013).

Obwohl der Fokus der miRNA-Forschung nach wie vor auf dem Gebiet der Tumorerkrankungen liegt, konnte die Relevanz von miRNAs in der Pathogenese des humanen T2DM durch die Ergebnisse zahlreicher Studien der letzten Jahre unterstrichen werden. MiRNAs sind nicht nur in die Organogenese der pankreatischen Inselzellen, in die Insulinproduktion und -sekretion der β -Zellen und die Entstehung der Insulinresistenz involviert, sondern spielen auch eine wichtige Rolle in der Adipogenese und dem Lipidstoffwechsel (DEHWAH et al., 2012; SHANTIKUMAR et al., 2012; MAO et al., 2013). Desweiteren mehren sich die Hinweise, dass sich die miRNA-Expressionsprofile bereits in einem frühen Krankheitsstadium verändern, so dass sich ein miRNA-Profil zur

Frühdiagnose eines T2DM eignen könnte (ROME, 2013). In der vorliegenden Studie waren zwei (miR-122 und miR-193b) der 227 mittels miRNA-Microarray identifizierten miRNAs im Serum neu-diagnostizierter diabetischer Katzen statistisch signifikant hochreguliert. Weitere fünf miRNAs (miR-129-2-3p, miR-139-3p, miR-375, miR-378b und miR-483*) zeigten eine Tendenz zu einer verstärkten und zwölf miRNAs (miR-1188, miR-1892, miR-1894-3p, miR-1896, miR-1907, miR-1971, miR-23a*, miR-3085-5p, miR-344f-3p, miR-3474, miR-351* und miR-598*) zu einer verminderten Expression. Eine hierarchische Clusteranalyse, bei der diese 19 miRNAs berücksichtigt wurden, konnte die gesunden normalgewichtigen Katzen eindeutig von den neu-diagnostizierten diabetischen trennen. Es konnte somit gezeigt werden, dass auch bei Katzen ein Diabetes mellitus mit einem veränderten miRNA-Expressionsprofil einhergeht.

Bisher wurden nur wenige Studien durchgeführt, um die Expressionsmuster zirkulierender miRNAs bei Diabetes mellitus zu bestimmen. ZHOU und Mitarbeiter (2012) berichteten, dass miR-181a im Serum von humanen T2DM-Patienten verstärkt exprimiert wird und die Erhöhung dieser miRNA sowohl in der Zellkultur als auch im Mausmodell mit hepatischer Insulinresistenz assoziiert ist (ZHOU et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte miR-181a zwar detektiert werden, zeigte aber keine veränderte Expression in den neu-diagnostizierten diabetischen Katzen. Im Vergleich zu T2DM-verdächtigen Menschen mit normaler Glukosetoleranz wurde eine verstärkte Expression von sieben miRNAs (miR-9, miR-29a, miR-30d, miR-34a, miR-124a, miR-146a und miR-375) im Serum neu-diagnostizierter Diabetiker gefunden (KONG et al., 2011). MiR-124a war in der vorliegenden Arbeit nicht auf dem miRNA-Microarray enthalten und miR-9 konnte nicht nachgewiesen werden. Die restlichen fünf miRNAs waren zwar detektierbar, aber nur miR-375 zeigte eine erhöhte Expression bei den neu-diagnostizierten diabetischen Katzen. Dieses Resultat konnte allerdings nicht mittels RT-qPCR bestätigt werden, da der Maus-spezifische-Assay mit dem Probenmaterial Katzenserum keine validen Ergebnisse lieferte. MiR-375 wird in den Inselzellen des Pankreas sehr stark exprimiert und ist durch Regulierung der Insulin- und Glukagonsekretion, der Insulingenexpression, der α - und β -Zell-Zahl sowie der Pankreasentwicklung entscheidend an der Glukosehomöostase beteiligt (POY et al., 2004; KLOOSTERMAN et al., 2007; EL OUAAMARI et al., 2008; POY et al., 2009).

Es konnte unter anderem gezeigt werden, dass die verstärkte Expression von miR-375 zu einer verminderten GSIS führt (POY et al., 2004). Die mittels miRNA-Microarray in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen gefundene erhöhte Expression von miR-375 könnte demnach ursächlich an der beeinträchtigten Insulinsekretion beim feline T2DM beteiligt sein.

MiR-122 ist die am stärksten exprimierte miRNA in der Leber mit einem Anteil von mehr als 70 % am miRNA-Gesamtpool. Ihre mature Sequenz ist in allen Vertebratenspezies, in denen diese miRNA bisher nachgewiesen wurde, vollständig konserviert (JOPLING, 2012). MiR-122 spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Lipidstoffwechsels. Die Suppression dieser miRNA durch den Einsatz von antisense Oligonukleotiden oder Antagomirs führte im Plasma normalgewichtiger Mäuse zu reduzierten Cholesterol- und Triglyzeridkonzentrationen. Außerdem wurde in der Leber ein Anstieg der Fettsäureoxidation sowie eine Reduktion der Fettsäuren- und der Cholesterolsynthese beobachtet. Entsprechend führte die Inhibition von miR-122 in Diät-induzierten obesen Mäusen durch die Hemmung der Expression zahlreicher lipogener Gene zu einer Reduktion der Plasmacholesterolkonzentrationen sowie einer Verbesserung der vorhandenen hepatischen Steatose (KRÜTZFELDT et al., 2005; ESAU et al., 2006). Desweiteren wird eine veränderte Expression von miR-122 bei Lebererkrankungen der unterschiedlichsten Ätiologien, wie etwa Neoplasien und Infektionen mit dem Hepatitis-C-Virus, beobachtet (ZHANG et al., 2010a; CERMELLI et al., 2011; STARKEY LEWIS et al., 2011; XU et al., 2011; ZHANG et al., 2011). So konnten im Serum von Patienten mit nicht-alkoholinduzierter Fettlebererkrankung signifikant erhöhte miR-122-Konzentrationen gemessen werden, die mit dem Schweregrad der Erkrankung (von einer einfachen hepatischen Steatose hin zu einer Steatohepatitis) korreliert waren (CERMELLI et al., 2011). Interessanterweise waren die Serum- und Plasmalevel von miR-122 bei Lebererkrankungen typischerweise erhöht, während die Level im Lebergewebe selbst erniedrigt sind (WANG et al., 2009). In einer Studie von ZAMPETAKI und Mitarbeitern (2010) konnte eine erhöhte miR-122-Expression im Plasma von humanen T2DM-Patienten mittels TaqMan-miRNA-Array identifiziert werden. In die nachfolgende Quantifizierung von 13 miRNAs mittels qPCR wurde miR-122 allerdings aufgrund der Ergebnisse einer durchgeführten miRNA-

Netzwerkanalyse nicht mehr eingeschlossen (ZAMPETAKI et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wies miR-122 in der RT-qPCR mit einer nahezu 100-fach erhöhten Expression den größten Unterschied zwischen neu-diagnostizierten diabetischen Katzen und gesunden Kontrolltieren auf. Die beobachtete Erhöhung von miR-122 im Serum neu-diagnostizierter diabetischer Katzen könnte einerseits Folge einer Hepatozytenschädigung aufgrund des Vorliegens einer diabetischen Ketoazidose oder einer Hepatolipidose sein. Andererseits besteht aber auch die Möglichkeit, dass miR-122 von intakten Hepatozyten aktiv in die Zirkulation freigesetzt wurde, um über den Weg der interzellulären Kommunikation die Genexpression in anderen Zellen zu beeinflussen.

In der vorliegenden Studie zeigte miR-193b in der RT-qPCR eine ca. 20-fach höhere Expression im Serum neu-diagnostizierter diabetischer Katzen im Vergleich zu gesunden Tieren. Bisher wurde eine veränderte Expression von miR-193b hauptsächlich im Zusammenhang mit verschiedenen neoplastischen Erkrankungen beschrieben, wobei in der Regel eine verminderte Expression dieser miRNA im jeweiligen Tumorgewebe zu beobachten war (CHEN et al., 2010; XU et al., 2010; GAO et al., 2011; YOSHIMOTO et al., 2011). MiR-193b agiert als Tumorsuppressor und inhibiert durch Beeinflussung von Onkogenen (z. B. Transkriptionsfaktoren und Genen, die an der Regulierung des Zellzyklus beteiligt sind) die Zellproliferation sowie die Zellmigration und -invasion (XU et al., 2010). Einige der mutmaßlichen Ziel-mRNAs von miR-193b können mit Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht werden, darunter der Transkriptionsfaktor ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit (CARAMUTA et al., 2010). Es ist bekannt, dass ARNT die Transkription einiger Gene reguliert, die in die Pathogenese des Diabetes mellitus involviert sind. Im Vergleich zu Menschen mit normaler Glukosetoleranz wurde eine verminderte Expression von ARNT in Inselzellen des Pankreas von T2DM-Patienten gefunden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Knockout von ARNT in kultivierten β -Zellen sowie im Mausmodell zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz, einer verminderten Glukose-stimulierten Insulinsekretion sowie zu Veränderungen in der Genexpression der Inselzellen führt, welche denen in humanen T2DM-Inselzellen ähneln (GUNTON et al., 2005). Eine verstärkte Expression von miR-193b könnte somit durch eine Inhibition von ARNT eine entscheidende Rolle in der Entstehung der β -Zell-

Dysfunktion beim T2DM spielen. Die Rezeptor-Tyrosinkinase c-Kit ist an der Entwicklung, dem Erhalt und der Funktion der pankreatischen β -Zellen beteiligt. Mäuse mit heterozygoter c-Kit-Rezeptor-Mutation (c-Kit^{W-v/+}) zeigen ein frühes Einsetzen von Diabetes mellitus, welcher u. a. durch erhöhte Nüchternglukosekonzentrationen, beeinträchtigte Glukosetoleranz, herabgesetzte Insulinsekretion, reduzierte β -Zell-Masse und β -Zell-Proliferation sowie einen verminderten Insulingehalt gekennzeichnet ist (KRISHNAMURTHY et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie weisen darauf hin, dass miR-193b in die Pathogenese des feline T2DM involviert sein könnte, indem es Proteine, wie Transkriptionsfaktoren oder Rezeptor-Tyrosinkinasen, hemmt, die essentiell für die Funktion und den Erhalt der pankreatischen β -Zellen sind.

MiR-483* zeigte im miRNA-Microarray einen Trend zu einer verstärkten Expression, jedoch konnte nach Durchführung der Korrektur für multiple Vergleiche keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Mittels sensitiverer RT-qPCR ließ sich auch für miR-483* eine statistisch signifikante, ca. 6-fach erhöhte, Expression in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen demonstrieren. MiR-483 ist in proliferative und neoplastische Prozesse involviert und agiert als antiapoptotisches Onkogen (VERONESE et al., 2010; HAO et al., 2011; MA et al., 2012). Auch für miR-483 kann eine Verbindung zum Diabetes mellitus hergestellt werden. Ein prädiabetischer Phänotyp mit Insulinresistenz und verminderter Glukosetoleranz lässt sich bei den Nachkommen eines Rattenmodells mit maternaler Proteinrestriktion ebenso wie bei erwachsenen Menschen mit zu niedrigem Geburtsgewicht nachweisen. In beiden Fällen konnte eine ca. 2-fach erhöhte Expression von miR-483-3p im Fettgewebe identifiziert werden, welche durch Hemmung der Adipozytendifferenzierung und Reduktion der Fettgewebsmasse und Fettzellgröße zu einer langanhaltenden Verminderung der Fettspeicherkapazität führte. Die Autoren schlussfolgerten, dass es infolgedessen zu einer ektopischen Fettablagerung mit nachfolgender Lipotoxizität und Insulinresistenz kommt, wodurch der prädiabetische Phänotyp in Ratten und Menschen mit einer suboptimalen pränatalen Ernährung zu erklären wäre (FERLAND-MCCOLLOUGH et al., 2012). Bei neu-diagnostizierten diabetischen Katzen könnte die erhöhte Expression von miR-483* somit einen Marker für Insulinresistenz darstellen.

Weitere 15 miRNAs zeigten vor Durchführung der Korrektur für multiple Vergleiche eine statistisch signifikant veränderte Expression in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen. Auf welche Art und Weise sie in die Pathogenese des T2DM involviert sein könnten, lässt sich für die meisten dieser miRNAs aufgrund von fehlenden Informationen über ihre Funktion zurzeit kaum abschätzen. Lediglich für miR-1907 kann ein direkter Zusammenhang mit Diabetes mellitus hergestellt werden. In einem Streptozotocin-induzierten Diabetesmodell der Maus zur Simulation des Frühstadiums einer diabetischen Nephropathie wurde eine verminderte Expression von miR-1907 in den Glomeruli der Niere im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren gefunden (CHEN et al., 2012b). Auch miR-23a könnte eine Rolle in der Pathogenese des T2DM spielen, da diese miRNA im Skelettmuskel an der Regulation der Insulin-stimulierten Glukoseaufnahme beteiligt zu sein scheint (Raychaudhuri, 2012). Allerdings zeigte miR-23a lediglich in Patienten mit metabolischem Syndrom oder Hypercholesterolämie, nicht jedoch bei T2DM-Patienten eine veränderte Expression (KAROLINA et al., 2012). MiR-351 scheint an der Regulation zellulärer Differenzierungs- und Proliferationsprozesse beteiligt zu sein, während die miRNAs miR-344 und miR-378 vermutlich speziell in die Adipogenese involviert sind (QIN et al., 2010; CHEN et al., 2012a; LI et al., 2012; SACCO & ADELI, 2012). Überwiegend bei neoplastischen Erkrankungen wurden bisher die miRNAs miR-129-2, miR-139-3p, miR-378 und miR-598 nachgewiesen (ZHAO et al., 2009; LIN et al., 2011; QIAN et al., 2013; YU et al., 2013; ZHAO et al., 2013). Für die miRNAs miR-1188, miR-1892, miR-1894 miR-1896, miR-1971, miR-3085-5p und miR-3474 liegen bisher keine oder nur vereinzelt Studien vor (HUPPI et al., 2011; GUO et al., 2012; SCHMIDT et al., 2013).

Katzen mit T2DM können eine Remission des Diabetes erreichen, vorausgesetzt, dass die β -Zellen noch eine ausreichende Restfunktion besitzen und mit einer frühzeitigen und individuell angepassten Therapie eine gute glykämische Kontrolle erreicht werden kann. Fast immer ist dafür die Verabreichung eines Insulins erforderlich. Die dauerhafte Senkung der Blutglukose führt zu einem Rückgang der Glukotoxizität und somit einer Verbesserung der Insulinsensitivität sowie der Insulinsekretionskapazität der β -Zellen. Infolgedessen sind die Tiere trotz Absetzens der Insulintherapie wieder in der Lage, ihre Blutglukosekonzentrationen im physiologischen Bereich zu halten. Obwohl diabetische

Katzen während der Remission normoglykämisch sind und auch keine klinischen Symptome eines Diabetes mellitus mehr aufweisen, befinden sie sich nichtsdestotrotz in einem subklinischen diabetischen Zustand, in dem die Insulinsekretionskapazität der β -Zellen nach wie vor beeinträchtigt sein kann und auch das Fortbestehen einer peripheren Insulinresistenz möglich ist (RAND, 1999; REUSCH et al., 2006; GOTTLIEB & RAND, 2013; OSTO et al., 2013). Bisher existieren keine Studien, die untersucht haben, inwieweit sich das miRNA-Expressionsmuster durch das Auftreten einer Remission verändert. In der vorliegenden Arbeit konnte eine 7- bis 40-fach erhöhte Expression für miR-122, miR-193b und miR-483* in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen im Vergleich zu diabetischen Katzen in Remission gefunden werden. Zwischen den gesunden Katzen und den normoglykämischen diabetischen Tieren in Remission waren jedoch keine Expressionsunterschiede für diese drei miRNAs nachweisbar. Dies könnte darauf hindeuten, dass die verstärkte Expression dieser miRNAs mit der Hyperglykämie der neu-diagnostizierten Diabetiker und nicht etwa mit einer Insulinresistenz oder einer β -Zell-Dysfunktion in Verbindung steht. Unterstützt wird dieses Hypothese dadurch, dass für einige miRNAs bereits gezeigt werden konnte, dass ihre Expressionshöhe durch erhöhte Blutglukosekonzentrationen beeinflusst wird (TANG et al., 2009; ESGUERRA et al., 2011; SUN et al., 2011). Da bei 63 % der neu-diagnostizierten diabetischen Katzen zum Zeitpunkt der Serumentnahme eine diabetische Ketoazidose vorgelegen hat, lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass die erhöhte Expression dieser miRNAs den ketoazidotischen Zustand der neu-diagnostizierten Diabetiker widerspiegelt.

Die kleine Gruppengröße sowie die Heterogenität der klinischen Parameter innerhalb der einzelnen Gruppen können als Limitationen der vorliegenden Arbeit angesehen werden. Die Gruppen waren jedoch groß und homogen genug, so dass eine hierarchische Clusteranalyse eindeutig die gesunden normalgewichtigen von den neu-diagnostizierten diabetischen Katzen separieren konnte. Zurzeit gibt es keine einheitlichen Richtlinien, auf welche Art und Weise die Normalisierung bei miRNAs durchzuführen ist. Aufgrund dessen wurden in dieser Arbeit gleichbleibend von jeder Probe 400 μ l Serum zur Extraktion der Gesamt-RNA eingesetzt. Die Ergebnisse der RT-qPCR wurden an zwei small nuclear RNAs (snRNAs) (RNU1A1 und RNU6B2) mit hohem oder mittlerem Expressionslevel normalisiert. Beide verwendeten snRNAs sind in früheren Studien bereits

erfolgreich zur Normalisierung von miRNAs in humanen Plasmaproben eingesetzt worden (NG et al., 2009; YAMAN AGAOGLU et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die miRNA-Expression im Serum von gesunden normalgewichtigen, neu-diagnostizierten diabetischen Katzen und diabetischen Katzen in Remission untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass ein globales miRNA-Expressionsprofil auch mit kleinen Volumina von Katzenserum realisierbar ist. Mittels Maus-spezifischer miRNA-Microarrays wurden mehr als 200 miRNAs nachgewiesen. Wie beim Menschen zeigten neu-diagnostizierte diabetische Katzen ein verändertes miRNA-Expressionsprofil im Serum. Die Signatur aus den 19 verändert exprimierten miRNAs konnte diese Katzen eindeutig von den gesunden normalgewichtigen Tieren separieren. Die hochregulierte Expression von drei miRNAs (miR-122, miR-193b und miR-483*) wurde anschließend mittels RT-qPCR bestätigt. Die verändert exprimierten miRNAs könnten in die Pathogenese des felines T2DM involviert sein, indem sie die β -Zell-Funktion und die Insulinsensitivität beeinträchtigen. MiRNA-Profiling ist eine vielversprechende Methode, nicht nur um die zugrundeliegenden Mechanismen der Diabetes-mellitus-Pathogenese zu entschlüsseln, sondern auch um Biomarker für eine frühzeitige Diagnose oder zur Stellung einer Prognose zu entwickeln und um neue therapeutische Ansätze zu finden. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können somit als Ausgangspunkt für weitere Studien zur Untersuchung der Rolle von miRNAs in der Pathogenese des felines T2DM, in den verschiedenen Diabetesstadien, wie etwa der Remission eines Diabetes, sowie bei Prädispositionen, wie Obesitas, dienen. Da die Hauskatze als spontanes Tiermodell für den humanen T2DM angesehen werden kann, könnten gewonnene Erkenntnisse auch für die humanmedizinische Forschung von Interesse sein.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Diabetes mellitus ist die zweithäufigste Endokrinopathie bei Katzen und geht in vielen Fällen mit schwerwiegenden, teils lebensbedrohlichen Komplikationen einher. MicroRNAs (MiRNAs) vermitteln überwiegend repressive Effekte auf die Genexpression, und es ist bekannt, dass sie in die Pathogenese des humanen Typ-2-Diabetes-mellitus involviert sind und ein großes Potential als diagnostische Biomarker aufweisen. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob miRNAs in Katzenserum nachweisbar sind und ob, wie beim Menschen, Unterschiede in den miRNA-Expressionsmustern zwischen gesunden und diabetischen Katzen bestehen.

Aus jeweils 400 µl Serum von gesunden normalgewichtigen Katzen (n = 8), neu-diagnostizierten diabetischen Katzen (n = 8) sowie diabetischen Katzen in Remission (n = 4) wurde Gesamt-RNA extrahiert. Die Serumproben der gesunden normalgewichtigen und der neu-diagnostizierten diabetischen Katzen wurden zur Erstellung globaler miRNA-Expressionsprofile verwendet. Hierfür wurden miRNA-Microarrays eingesetzt, die 1079 verschiedene murine miRNAs detektieren können. Zur Bestätigung der miRNA-Microarray-Ergebnisse wurde anschließend eine Reverse-Transkription-quantitative-Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) mit Maus-spezifischen-Assays für drei Ziel-miRNAs (miR-122, miR-193b und miR-483*) durchgeführt. In der RT-qPCR wurden Serumproben aller drei Gruppen (jeweils n = 4) verwendet.

Es konnte gezeigt werden, dass feline Serum-miRNAs mittels Maus-spezifischer Detektionsmethoden nachgewiesen werden können. Lediglich der RT-qPCR-Assay für miR-375 lieferte mit feline Serum keine validen Ergebnisse. Insgesamt wurden 227 verschiedene miRNAs mittels miRNA-Microarray im Katzenserum detektiert. Neunzehn miRNAs wiesen eine veränderte Expression bei neu-diagnostizierten diabetischen Katzen auf (p-Wert < 0,01). Obwohl nach der Durchführung der Korrektur für multiple Vergleiche die veränderte Expression nur für zwei miRNAs (miR-122 und miR-193b) statistisch signifikant (p-Wert < 0,05) blieb, konnte eine hierarchische Clusteranalyse auf Grundlage dieser 19 miRNAs die gesunden normalgewichtigen Katzen eindeutig von der Gruppe der neu-diagnostizierten diabetischen separieren. Unter Verwendung

muriner RT-qPCR-Assays wurde für miR-122 eine 100-fach und für miR-193b eine 18-fach erhöhte Expression in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen im Vergleich zu gesunden normalgewichtigen Katzen nachgewiesen, während der Vergleich mit diabetischen Katzen in Remission für miR-122 eine 40-fach und für miR-193b eine 15-fach verstärkte Expression zeigte. MiR-483* wurde in neu-diagnostizierten diabetischen Katzen ca. 6-fach stärker exprimiert als in den beiden anderen Gruppen (alle p-Werte < 0,05).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass auch kleine Volumina an Serum ausreichend Material enthalten, um ein globales miRNA-Expressionsprofil bei Katzen zu erstellen. Genau wie beim Menschen weisen neu-diagnostizierte diabetische Katzen ein verändertes miRNA-Expressionsmuster auf. Zirkulierende miRNAs besitzen somit auch beim feline Typ-2-Diabetes-mellitus ein großes Potential als Biomarker. Die verstärkt exprimierten miRNAs könnten außerdem in Prozesse involviert sein, die eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des Typ-2-Diabetes-mellitus spielen, wie die Entstehung einer Insulinresistenz oder einer β -Zell-Dysfunktion.

VI. SUMMARY

Diabetes mellitus is the second most common endocrinopathy in cats and is often accompanied by severe, sometimes life-threatening complications. MicroRNAs (MiRNAs) predominantly repress gene expression and are known to be involved in the pathogenesis of human type 2 diabetes mellitus. Furthermore, they have great potential as diagnostic biomarkers for this disease. The purpose of this study was to investigate whether miRNAs are detectable in feline serum and whether, like in humans, miRNA expression profiles differ between healthy and diabetic cats.

Total RNA was extracted from 400 μ l serum of healthy lean cats ($n = 8$), newly diagnosed diabetic cats ($n = 8$), and cats in diabetic remission ($n = 4$). Serum samples of healthy lean and newly diagnosed diabetic cats were used to generate global miRNA expression profiles using miRNA microarrays, which represented 1079 mouse miRNA targets. To validate the results, reverse transcriptase quantitative real-time PCR (RT-qPCR) with mouse-specific assays for three target miRNAs (miR-122, miR-193b, and miR-483*) was performed using serum samples of all three groups ($n = 4$ each).

Feline serum miRNAs were detectable using mouse specific detection methods. Only the RT-qPCR assay for miR-375 did not yield reliable results with feline serum. A total of 227 distinct miRNAs were detected by miRNA microarrays. Nineteen miRNAs were differentially expressed in newly diagnosed diabetic cats (p -values < 0.01). Although the differential expression of only two miRNAs (miR-122 and miR-193b) was significantly different after correction for multiple testing (p -values < 0.05), hierarchical cluster analysis of these 19 miRNAs clearly grouped healthy lean and newly diagnosed diabetic cats into separate clusters. Using specific RT-qPCR assays, miR-122 expression was found to be 100- and 40-fold higher in newly diagnosed diabetic cats compared to healthy lean cats and cats in diabetic remission, while miR-193b expression was found to be 18- and 15-fold higher. MiR-483* was expressed about 6-fold higher in newly diagnosed diabetic cats compared to both other groups (all p -values < 0.05).

The results of this study demonstrate that small volumes of serum samples yield sufficient material to permit global miRNA expression profiling in cats. Just like

in humans, newly diagnosed diabetic cats show an altered miRNA expression profile. Therefore, circulating miRNAs can be considered potential biomarkers for feline type 2 diabetes mellitus. Furthermore, the upregulated miRNAs might be involved in processes, which are known to play a decisive role in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus, such as the development of insulin resistance or β -cell dysfunction.

VII. LITERATURVERZEICHNIS

Ambros V. The evolution of our thinking about microRNAs. *Nat Med* 2008; 14: 1036-40.

Axtell MJ, Westholm JO, Lai EC. Vive la difference: biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biol* 2011; 12: 221.

Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, Holtz J, Eachus R, Pasquinelli AE. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell* 2005; 122: 553-63.

Baroukh N, Ravier MA, Loder MK, Hill EV, Bounacer A, Scharfmann R, Rutter GA, Van Obberghen E. MicroRNA-124a regulates Foxa2 expression and intracellular signaling in pancreatic beta-cell lines. *J Biol Chem* 2007; 282: 19575-88.

Barrey E, Bonnamy B, Barrey EJ, Mata X, Chaffaux S, Guerin G. Muscular microRNA expressions in healthy and myopathic horses suffering from polysaccharide storage myopathy or recurrent exertional rhabdomyolysis. *Equine Vet J* 2010; Suppl. 38: 303-10.

Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-97.

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136: 215-33.

Basyuk E, Suavet F, Doglio A, Bordonne R, Bertrand E. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: 6593-7.

Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010; 50: 244-9.

Boggs RM, Moody JA, Long CR, Tsai KL, Murphy KE. Identification, amplification and characterization of miR-17-92 from canine tissue. *Gene* 2007; 404: 25-30.

Boggs RM, Wright ZM, Stickney MJ, Porter WW, Murphy KE. MicroRNA expression in canine mammary cancer. *Mamm Genome* 2008; 19: 561-9.

Bohnsack MT, Czaplinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-91.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-101.

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10: 1957-66.

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 15524-9.

Caramuta S, Egyhazi S, Rodolfo M, Witten D, Hansson J, Larsson C, Lui WO. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 2062-70.

Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.

Cermelli S, Ruggieri A, Marrero JA, Ioannou GN, Beretta L. Circulating microRNAs in patients with chronic hepatitis C and non-alcoholic fatty liver disease. *PLoS One* 2011; 6: e23937.

Chen J, Feilotter HE, Pare GC, Zhang X, Pemberton JG, Garady C, Lai D, Yang X, Tron VA. MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. *Am J Pathol* 2010; 176: 2520-9.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Wang J, Jiang X, Xiang Y, Xu C, Zheng P, Zhang J, Li R, Zhang H, Shang X, Gong T, Ning G, Zen K, Zhang CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006.

Chen Y, Melton DW, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. MiR-351 transiently increases during muscle regeneration and promotes progenitor cell proliferation and survival upon differentiation. *Physiol Genomics* 2012a; 44: 1042-51.

Chen YQ, Wang XX, Yao XM, Zhang DL, Yang XF, Tian SF, Wang NS. Abated microRNA-195 expression protected mesangial cells from apoptosis in early diabetic renal injury in mice. *J Nephrol* 2012b; 25: 566-76.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4.

Cifuentes D, Xue H, Taylor DW, Patnode H, Mishima Y, Cheloufi S, Ma E, Mane S, Hannon GJ, Lawson ND, Wolfe SA, Giraldez AJ. A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 2010; 328: 1694-8.

Dehwah MA, Xu A, Huang Q. MicroRNAs and type 2 diabetes/obesity. *J Genet Genomics* 2012; 39: 11-8.

Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-5.

Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nat Struct Mol Biol* 2006; 13: 849-51.

El Ouaamari A, Baroukh N, Martens GA, Lebrun P, Pipeleers D, van Obberghen E. miR-375 targets 3'-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 and regulates glucose-induced biological responses in pancreatic beta-cells. *Diabetes* 2008; 57: 2708-17.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* 2006; 3: 87-98.

Esguerra JL, Bolmeson C, Cilio CM, Eliasson L. Differential glucose-regulation of microRNAs in pancreatic islets of non-obese type 2 diabetes model Goto-Kakizaki rat. *PLoS One* 2011; 6: e18613.

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 259-69.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 346-53.

Ferland-McCollough D, Fernandez-Twinn DS, Cannell IG, David H, Warner M, Vaag AA, Bork-Jensen J, Brons C, Gant TW, Willis AE, Siddle K, Bushell M, Ozanne SE. Programming of adipose tissue miR-483-3p and GDF-3 expression by maternal diet in type 2 diabetes. *Cell death and differentiation* 2012; 19: 1003-12.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-14.

Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92-105.

Gallagher IJ, Scheele C, Keller P, Nielsen AR, Remenyi J, Fischer CP, Roder K, Babraj J, Wahlestedt C, Hutvagner G, Pedersen BK, Timmons JA. Integration of microRNA changes in vivo identifies novel molecular features of muscle insulin resistance in type 2 diabetes. *Genome Med* 2010; 2: 9.

Gao XN, Lin J, Gao L, Li YH, Wang LL, Yu L. MicroRNA-193b regulates c-Kit proto-oncogene and represses cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2011; 35: 1226-32.

Gastaldelli A. Role of beta-cell dysfunction, ectopic fat accumulation and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 93 Suppl 1: S60-5.

Gilad S, Meiri E, Yogev Y, Benjamin S, Lebanony D, Yerushalmi N, Benjamin H, Kushnir M, Cholakh H, Melamed N, Bentwich Z, Hod M, Goren Y, Chajut A. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* 2008; 3: e3148.

Gioia G, Mortarino M, Gelain ME, Albonico F, Ciusani E, Forno I, Marconato L, Martini V, Comazzi S. Immunophenotype-related microRNA expression in canine chronic lymphocytic leukemia. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 142: 228-35.

Gottlieb S, Rand JS. Remission in cats: including predictors and risk factors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2013; 43: 245-9.

Grassmann R, Jeang KT. The roles of microRNAs in mammalian virus infection. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 706-11.

Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, Shiekhatter R. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 2004; 432: 235-40.

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhatter R. Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 2005; 123: 631-40.

Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109-11.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: D140-4.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D154-8.

Gu Z, Eleswarapu S, Jiang H. Identification and characterization of microRNAs from the bovine adipose tissue and mammary gland. *FEBS Lett* 2007; 581: 981-8.

Guariguata L. By the numbers: new estimates from the IDF Diabetes Atlas Update for 2012. *Diabetes Res Clin Pract* 2012; 98: 524-5.

Guarnieri DJ, DiLeone RJ. MicroRNAs: a new class of gene regulators. *Ann Med* 2008; 40: 197-208.

Guay C, Roggli E, Nesca V, Jacovetti C, Regazzi R. Diabetes mellitus, a microRNA-related disease? *Transl Res* 2011; 157: 253-64.

Gunton JE, Kulkarni RN, Yim S, Okada T, Hawthorne WJ, Tseng YH, Roberson RS, Ricordi C, O'Connell PJ, Gonzalez FJ, Kahn CR. Loss of ARNT/HIF1 β mediates altered gene expression and pancreatic-islet dysfunction in human type 2 diabetes. *Cell* 2005; 122: 337-49.

Guo L, Yang X, Duan T. Altered microRNA expression profile in maternal and fetal liver of HBV transgenic mouse model. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; 25: 2071-7.

Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; 6: 961-7.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Kim YK, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 2004; 18: 3016-27.

Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT, Kim VN. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.

Hao J, Zhang S, Zhou Y, Hu X, Shao C. MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. *FEBS Lett* 2011; 585: 207-13.

He A, Zhu L, Gupta N, Chang Y, Fang F. Overexpression of micro ribonucleic acid 29, highly up-regulated in diabetic rats, leads to insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 2007; 21: 2785-94.

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Wills QF, Kaisaki PJ, Barrett A, Camps C, Fernandez C, Ragoussis J, Gauguier D, McCarthy MI, Lindgren CM. MicroRNA-125a is over-expressed in insulin target tissues in a spontaneous rat model of Type 2 Diabetes. *BMC Med Genomics* 2009; 2: 54.

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, Ria M, Barrett A, Collins S, Kaisaki P, Argoud K, Fernandez C, Travers ME, Grew JP, Randall JC, Gloyn AL, Gauguier D, McCarthy MI, Lindgren CM. Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2010; 53: 1099-109.

Huang B, Qin W, Zhao B, Shi Y, Yao C, Li J, Xiao H, Jin Y. MicroRNA expression profiling in diabetic GK rat model. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2009; 41: 472-7.

Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ. Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 2011a; 67: 129-39.

Huang Y, Zou Q, Wang SP, Tang SM, Zhang GZ, Shen XJ. The discovery approaches and detection methods of microRNAs. *Mol Biol Rep* 2011b; 38: 4125-35.

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 2008; 3: e3694.

Huppi K, Pitt J, Wahlberg B, Caplen NJ. Genomic instability and mouse microRNAs. *Toxicol Mech Methods* 2011; 21: 325-33.

Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 2001; 293: 834-8.

Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.

Ibanez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and human microRNAs highlight the extensive conservation of microRNAs in biology. *PLoS One* 2008; 3: e2818.

Iguchi H, Kosaka N, Ochiya T. Secretory microRNAs as a versatile communication tool. *Commun Integr Biol* 2010; 3: 478-81.

Ismail-Beigi F. Pathogenesis and glycemic management of type 2 diabetes mellitus: a physiological approach. *Arch Iran Med* 2012; 15: 239-46.

Ji F, Yang B, Peng X, Ding H, You H, Tien P. Circulating microRNAs in hepatitis B virus-infected patients. *J Viral Hepat* 2011; 18: e242-51.

Jin W, Dodson MV, Moore SS, Basarab JA, Guan LL. Characterization of microRNA expression in bovine adipose tissues: a potential regulatory mechanism of subcutaneous adipose tissue development. *BMC Mol Biol* 2010; 11: 29.

Joglekar MV, Joglekar VM, Hardikar AA. Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. *Gene Expr Patterns* 2009; 9: 109-13.

Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol* 2012; 9: 137-42.

Jordan SD, Kruger M, Willmes DM, Redemann N, Wunderlich FT, Bronneke HS, Merkwirth C, Kashkar H, Olkkonen VM, Bottger T, Braun T, Seibler J, Bruning JC. Obesity-induced overexpression of miRNA-143 inhibits insulin-stimulated AKT activation and impairs glucose metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 434-46.

Karolina DS, Armugam A, Tavintharan S, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. MicroRNA 144 impairs insulin signaling by inhibiting the expression of insulin receptor substrate 1 in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 2011; 6: e22839.

Karolina DS, Tavintharan S, Armugam A, Sepramaniam S, Pek SL, Wong MT, Lim SC, Sum CF, Jeyaseelan K. Circulating miRNA profiles in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97: E2271-6.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-16.

Kim YK, Kim VN. Processing of intronic microRNAs. *EMBO J* 2007; 26: 775-83.

Kloosterman WP, Lagendijk AK, Ketting RF, Moulton JD, Plasterk RH. Targeted inhibition of miRNA maturation with morpholinos reveals a role for miR-375 in pancreatic islet development. *PLoS Biol* 2007; 5: e203.

Klötting N, Berthold S, Kovacs P, Schon MR, Fasshauer M, Ruschke K, Stumvoll M, Bluher M. MicroRNA expression in human omental and subcutaneous adipose tissue. *PLoS One* 2009; 4: e4699.

Kolfischoten IG, Roggli E, Nesca V, Regazzi R. Role and therapeutic potential of microRNAs in diabetes. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11 Suppl 4: 118-29.

Kong L, Zhu J, Han W, Jiang X, Xu M, Zhao Y, Dong Q, Pang Z, Guan Q, Gao L, Zhao J, Zhao L. Significance of serum microRNAs in pre-diabetes and newly diagnosed type 2 diabetes: a clinical study. *Acta Diabetol* 2011; 48: 61-9.

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 17442-52.

Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: D152-7.

Krishnamurthy M, Ayazi F, Li J, Lyttle AW, Woods M, Wu Y, Yee SP, Wang R. c-Kit in early onset of diabetes: a morphological and functional analysis of pancreatic beta-cells in c-Kit^{W-v} mutant mice. *Endocrinology* 2007; 148: 5520-30.

Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 2005; 438: 685-9.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9.

Landthaler M, Yalcin A, Tuschl T. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol* 2004; 14: 2162-7.

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.

Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, Banham AH, Pezzella F, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS, Harris AL. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol* 2008; 141: 672-5.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.

Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.

Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-70.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* 2004; 23: 4051-60.

Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 2006; 25: 522-32.

Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115: 787-98.

Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.

Li W, Ruan K. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 1117-24.

Li X, Feng R, Huang C, Wang H, Wang J, Zhang Z, Yan H, Wen T. MicroRNA-351 regulates TMEM 59 (DCF1) expression and mediates neural stem cell morphogenesis. *RNA Biol* 2012; 9: 292-301.

Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-73.

Lin M, Chen W, Huang J, Gao H, Ye Y, Song Z, Shen X. MicroRNA expression profiles in human colorectal cancers with liver metastases. *Oncol Rep* 2011; 25: 739-47.

Ling HY, Ou HS, Feng SD, Zhang XY, Tuo QH, Chen LX, Zhu BY, Gao ZP, Tang CK, Yin WD, Zhang L, Liao DF. Changes in microRNA profile and effects of miR-320 in insulin-resistant 3T3-L1 adipocytes. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2009; 36: e32-9.

Ling HY, Wen GB, Feng SD, Tuo QH, Ou HS, Yao CH, Zhu BY, Gao ZP, Zhang L, Liao DF. MicroRNA-375 promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation through modulation of extracellular signal-regulated kinase signalling. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2011; 38: 239-46.

Llave C, Xie Z, Kasschau KD, Carrington JC. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 2002; 297: 2053-6.

Lovis P, Gattesco S, Regazzi R. Regulation of the expression of components of the exocytotic machinery of insulin-secreting cells by microRNAs. *Biol Chem* 2008a; 389: 305-12.

Lovis P, Roggli E, Laybutt DR, Gattesco S, Yang JY, Widmann C, Abderrahmani A, Regazzi R. Alterations in microRNA expression contribute to fatty acid-induced pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 2008b; 57: 2728-36.

Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303: 95-8.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 9667-72.

Ma N, Li F, Li D, Hui Y, Wang X, Qiao Y, Zhang Y, Xiang Y, Zhou J, Zhou L, Zheng X, Gao X. Igf2-derived intronic miR-483 promotes mouse hepatocellular carcinoma cell proliferation. *Mol Cell Biochem* 2012; 361: 337-43.

Maniataki E, Mourelatos Z. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev* 2005; 19: 2979-90.

Mao Y, Mohan R, Zhang S, Tang X. MicroRNAs as pharmacological targets in diabetes. *Pharmacol Res* 2013; 75: 37-47.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004; 15: 185-97.

Mi QS, Weiland M, Qi RQ, Gao XH, Poisson LM, Zhou L. Identification of mouse serum miRNA endogenous references by global gene expression profiles. *PLoS One* 2012; 7: e31278.

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10513-8.

Mizuno H, Nakamura A, Aoki Y, Ito N, Kishi S, Yamamoto K, Sekiguchi M, Takeda S, Hashido K. Identification of muscle-specific microRNAs in serum of muscular dystrophy animal models: promising novel blood-based markers for muscular dystrophy. *PLoS One* 2011; 6: e18388.

Nelson RW. Diabetes mellitus in cats. In: *Small animal internal medicine*. 3rd ed. Nelson RW, Couto CG, eds. St. Louis: Mosby 2003: 749-62.

Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-81.

Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; 130: 89-100.

Okamura K, Phillips MD, Tyler DM, Duan H, Chou YT, Lai EC. The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol* 2008; 15: 354-63.

Okamura K. Diversity of animal small RNA pathways and their biological utility. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2012; 3: 351-68.

Ono K. MicroRNA links obesity and impaired glucose metabolism. *Cell Res* 2011; 21: 864-6.

Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell* 2008; 30: 460-71.

Osto M, Zini E, Reusch CE, Lutz TA. Diabetes from humans to cats. *Gen Comp Endocrinol* 2013; 182: 48-53.

Pandey AK, Agarwal P, Kaur K, Datta M. MicroRNAs in diabetes: tiny players in big disease. *Cell Physiol Biochem* 2009; 23: 221-32.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-9.

Perera RJ, Ray A. MicroRNAs in the search for understanding human diseases. *BioDrugs* 2007; 21: 97-104.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e36.

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Artus CG, Zoller T, Cougot N, Basyuk E, Bertrand E, Filipowicz W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-6.

Plaisance V, Abderrahmani A, Perret-Menoud V, Jacquemin P, Lemaigre F, Regazzi R. MicroRNA-9 controls the expression of Granuphilin/Slp4 and the secretory response of insulin-producing cells. *J Biol Chem* 2006; 281: 26932-42.

Pontius JU, Mullikin JC, Smith DR, Lindblad-Toh K, Gnerre S, Clamp M, Chang J, Stephens R, Neelam B, Volfovsky N, Schaffer AA, Agarwala R, Narfstrom K, Murphy WJ, Giger U, Roca AL, Antunes A, Menotti-Raymond M, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Johnson WE, Bourque G, Tesler G, O'Brien SJ. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. *Genome Res* 2007; 17: 1675-89.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-30.

Poy MN, Hausser J, Trajkovski M, Braun M, Collins S, Rorsman P, Zavolan M, Stoffel M. miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 5813-8.

Qavi AJ, Kindt JT, Bailey RC. Sizing up the future of microRNA analysis. *Anal Bioanal Chem* 2010; 398: 2535-49.

Qian J, Lin J, Qian W, Ma JC, Qian SX, Li Y, Yang J, Li JY, Wang CZ, Chai HY, Chen XX, Deng ZQ. Overexpression of miR-378 is frequent and may affect treatment outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2013; 37: 765-8.

Qin L, Chen Y, Niu Y, Chen W, Wang Q, Xiao S, Li A, Xie Y, Li J, Zhao X, He Z, Mo D. A deep investigation into the adipogenesis mechanism: profile of microRNAs regulating adipogenesis by modulating the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway. *BMC Genomics* 2010; 11: 320.

Rand J. Current understanding of feline diabetes: part 1, pathogenesis. *J Feline Med Surg* 1999; 1: 143-53.

Rand JS. Feline diabetes mellitus. In: Kirk's Current Veterinary Therapy XIV. Bonagura JD, Twedt DC, eds. St. Louis: Saunders 2009: 199-204.

Raychaudhuri S. MicroRNAs overexpressed in growth-restricted rat skeletal muscles regulate the glucose transport in cell culture targeting central TGF-beta factor SMAD4. *PLoS One* 2012; 7: e34596.

Rayner KJ, Hennessy EJ. Extracellular communication via microRNA: lipid particles have a new message. *J Lipid Res* 2013; 54: 1174-81.

Reddy AM, Zheng Y, Jagadeeswaran G, Macmil SL, Graham WB, Roe BA, Desilva U, Zhang W, Sunkar R. Cloning, characterization and expression analysis of porcine microRNAs. *BMC Genomics* 2009; 10: 65.

Reid G, Kirschner MB, van Zandwijk N. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol* 2011; 80: 193-208.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.

Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP. MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 2002; 16: 1616-26.

Reusch CE, Tschour F, Kley S, Boretti S, Sieber-Ruckstuhl N. [Diabetes mellitus in the cat: a review]. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2006; 148: 130-8.

Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 2002; 110: 513-20.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-10.

Rome S. Are extracellular microRNAs involved in type 2 diabetes and related pathologies? *Clin Biochem* 2013; 46: 937-45.

Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007; 448: 83-6.

Sacco J, Adeli K. MicroRNAs: emerging roles in lipid and lipoprotein metabolism. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 220-5.

Schmidt U, Herrmann L, Hagl K, Novak B, Huber C, Holsboer F, Wotjak CT, Buell DR. Therapeutic Action of Fluoxetine is Associated with a Reduction in Prefrontal Cortical miR-1971 Expression Levels in a Mouse Model of Posttraumatic Stress Disorder. *Front Psychiatry* 2013; 4: 66.

Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.

Seggerson K, Tang L, Moss EG. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol* 2002; 243: 215-25.

Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008; 455: 58-63.

Shantikumar S, Caporali A, Emanuelli C. Role of microRNAs in diabetes and its cardiovascular complications. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 583-93.

Sibley CR, Seow Y, Saayman S, Dijkstra KK, El Andaloussi S, Weinberg MS, Wood MJ. The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res* 2012; 40: 438-48.

Skog J, Wurdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT, Jr., Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10: 1470-6.

Song G, Wang L. A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals. *PLoS One* 2009; 4: e7829.

Starkey Lewis PJ, Dear J, Platt V, Simpson KJ, Craig DG, Antoine DJ, French NS, Dhaun N, Webb DJ, Costello EM, Neoptolemos JP, Moggs J, Goldring CE, Park BK. Circulating microRNAs as potential markers of human drug-induced liver injury. *Hepatology* 2011; 54: 1767-76.

Stedemann C, Bauersachs S, Weber K, Wess G. Detection and comparison of microRNA expression in the serum of Doberman Pinschers with dilated cardiomyopathy and healthy controls. *BMC Vet Res* 2013; 9: 12.

Sun LL, Jiang BG, Li WT, Zou JJ, Shi YQ, Liu ZM. MicroRNA-15a positively regulates insulin synthesis by inhibiting uncoupling protein-2 expression. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 91: 94-100.

Tang X, Muniappan L, Tang G, Ozcan S. Identification of glucose-regulated miRNAs from pancreatic β cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *RNA* 2009; 15: 287-93.

Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008; 110: 13-21.

Trajkovski M, Hausser J, Soutschek J, Bhat B, Akin A, Zavolan M, Heim MH, Stoffel M. MicroRNAs 103 and 107 regulate insulin sensitivity. *Nature* 2011; 474: 649-53.

Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011; 39: 7223-33.

Ul Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell Tissue Res* 2012; 349: 405-13.

Unno K, Zhou Y, Zimmerman T, Platanias LC, Wickrema A. Identification of a novel microRNA cluster miR-193b-365 in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2009; 50: 1865-71.

Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 654-9.

Van Rooij E. The art of microRNA research. *Circ Res* 2011; 108: 219-34.

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318: 1931-4.

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanesi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res* 2010; 70: 3140-9.

Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 2011; 13: 423-33.

Vickers KC, Remaley AT. Lipid-based carriers of microRNAs and intercellular communication. *Curr Opin Lipidol* 2012; 23: 91-7.

Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 4402-7.

Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 7248-59.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem* 2010; 56: 1733-41.

Westholm JO, Lai EC. Mirtrons: microRNA biogenesis via splicing. *Biochimie* 2011; 93: 1897-904.

Whiting DR, Guariguata L, Weil C, Shaw J. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030. *Diabetes Res Clin Pract* 2011; 94: 311-21.

Wightman B, Burglin TR, Gatto J, Arasu P, Ruvkun G. Negative regulatory sequences in the lin-14 3'-untranslated region are necessary to generate a temporal switch during *Caenorhabditis elegans* development. *Genes Dev* 1991; 5: 1813-24.

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855-62.

Xia HQ, Pan Y, Peng J, Lu GX. Over-expression of miR375 reduces glucose-induced insulin secretion in Nit-1 cells. *Mol Biol Rep* 2011; 38: 3061-5.

Xu C, Liu S, Fu H, Li S, Tie Y, Zhu J, Xing R, Jin Y, Sun Z, Zheng X. MicroRNA-193b regulates proliferation, migration and invasion in human hepatocellular carcinoma cells. *Eur J Cancer* 2010; 46: 2828-36.

Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, Zhang T, Huang L, Li H, Tan W, Wang C, Lin D. Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 2011; 50: 136-42.

Yaman Agaoglu F, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour Biol* 2011; 32: 583-8.

Yang Q, Lu J, Wang S, Li H, Ge Q, Lu Z. Application of next-generation sequencing technology to profile the circulating microRNAs in the serum of preeclampsia versus normal pregnant women. *Clin Chim Acta* 2011; 412: 2167-73.

Yekta S, Shih IH, Bartel DP. MicroRNA-directed cleavage of *HOXB8* mRNA. *Science* 2004; 304: 594-6.

Yendamuri S, Kratzke R. MicroRNA biomarkers in lung cancer: MiRacle or quagMiRe? *Transl Res* 2011; 157: 209-15.

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-6.

Yoshimoto N, Toyama T, Takahashi S, Sugiura H, Endo Y, Iwasa M, Fujii Y, Yamashita H. Distinct expressions of microRNAs that directly target estrogen receptor alpha in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2011; 130: 331-9.

Yu X, Luo L, Wu Y, Liu Y, Zhao X, Zhang X, Cui L, Ye G, Le Y, Guo J. Gastric juice miR-129 as a potential biomarker for screening gastric cancer. *Med Oncol* 2013; 30: 365.

Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, Mayr A, Weger S, Oberhollenzer F, Bonora E, Shah A, Willeit J, Mayr M. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res* 2010; 107: 810-7.

Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9779-84.

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Koppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81.

Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 2004; 118: 57-68.

Zhang J, Zhao H, Gao Y, Zhang W. Secretory miRNAs as novel cancer biomarkers. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1826: 32-43.

Zhang Y, Jia Y, Zheng R, Guo Y, Wang Y, Guo H, Fei M, Sun S. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem* 2010a; 56: 1830-8.

Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol Cell* 2010b; 39: 133-44.

Zhang Y, Liao Y, Wang D, He Y, Cao D, Zhang F, Dou K. Altered expression levels of miRNAs in serum as sensitive biomarkers for early diagnosis of traumatic injury. *J Cell Biochem* 2011; 112: 2435-42.

Zhao BS, Liu SG, Wang TY, Ji YH, Qi B, Tao YP, Li HC, Wu XN. Screening of microRNA in patients with esophageal cancer at same tumor node metastasis stage with different prognoses. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14: 139-43.

Zhao H, Guan J, Lee HM, Sui Y, He L, Siu JJ, Tse PP, Tong PC, Lai FM, Chan JC. Up-regulated pancreatic tissue microRNA-375 associates with human type 2 diabetes through beta-cell deficit and islet amyloid deposition. *Pancreas* 2010; 39: 843-6.

Zhao JJ, Yang J, Lin J, Yao N, Zhu Y, Zheng J, Xu J, Cheng JQ, Lin JY, Ma X. Identification of miRNAs associated with tumorigenesis of retinoblastoma by miRNA microarray analysis. *Childs Nerv Syst* 2009; 25: 13-20.

Zhao X, Mohan R, Ozcan S, Tang X. MicroRNA-30d induces insulin transcription factor MafA and insulin production by targeting mitogen-activated protein 4 kinase 4 (MAP4K4) in pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* 2012; 287: 31155-64.

Zhou B, Li C, Qi W, Zhang Y, Zhang F, Wu JX, Hu YN, Wu DM, Liu Y, Yan TT, Jing Q, Liu MF, Zhai QW. Downregulation of miR-181a upregulates sirtuin-1 (SIRT1) and improves hepatic insulin sensitivity. *Diabetologia* 2012; 55: 2032-43.

Zhou X, Duan X, Qian J, Li F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* 2009; 137: 159-64.

Zhu Z, He J, Jia X, Jiang J, Bai R, Yu X, Lv L, Fan R, He X, Geng J, You R, Dong Y, Qiao D, Lee KB, Smith GW, Dong C. MicroRNA-25 functions in regulation of pigmentation by targeting the transcription factor MITF in Alpaca (*Lama pacos*) skin melanocytes. *Domest Anim Endocrinol* 2010; 38: 200-9.

VIII. DANKSAGUNG

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion unterstützt haben. Mein Dank geht insbesondere an

Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann für die Möglichkeit, meine Promotion an der Medizinischen Kleintierklinik anzufertigen sowie für die intensive fachliche Ausbildung. Vielen Dank für die hervorragende Unterstützung und die wertvollen Anregungen bei der Erstellung meiner Dissertationsschrift sowie der Publikation.

Frau Dr. Karin Weber für die direkte Betreuung meiner Promotion und die Möglichkeit, ein solch innovatives Thema zu bearbeiten. Vielen Dank für die unermüdliche Unterstützung und sachkundige Anleitung, die geduldige Beantwortung all meiner Fragen und die konstruktiven und hilfreichen Verbesserungsvorschläge beim Verfassen von Publikation und Promotionsschrift.

Frau Dr. Astrid Wehner für die Betreuung der klinischen Aspekte meiner Promotion. Vielen Dank für die hervorragende endokrinologische Ausbildung, die geduldige Unterstützung bei allen sich daraus ergebenden Fragestellungen sowie die hilfreichen Anregungen beim Schreiben der Promotionsschrift.

Herrn Dr. Stefan Bauersachs für die Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der miRNA-Microarray-Experimente.

die Universität Bayern e.V., die mich durch ein Promotionsstipendium nach dem Bayerischen Eliteförderungsgesetz finanziell unterstützt hat.

alle Katzenbesitzer (v. a. Astrid Kuhn) für Ihre Bereitschaft, an meiner Studie teilzunehmen.

die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Medizinischen Kleintierklinik (besonders Frau Dr. Roswitha Dorsch) für die tolle Zeit, in der ich so unglaublich viel lernen durfte.

alle meine Freunde (insbesondere Kerstin, Michi und Katja), die mich immer wieder aufgemuntert und zum Durchhalten bewegt haben.

meine Eltern. Ich möchte mich von ganzem Herzen bei Euch dafür bedanken, dass Ihr trotz aller Höhen und Tiefen immer an mich geglaubt und mich unermüdlich unterstützt habt. Ohne Euch hätte ich das niemals geschafft!